

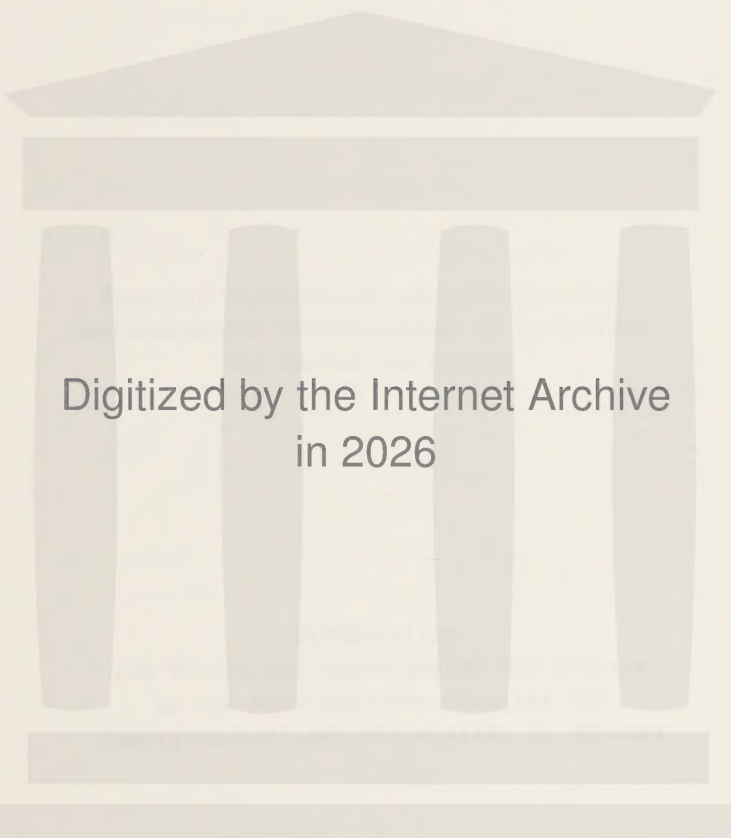
**ÜBER DIE DIFFERENZIERUNG VERSCHIEDENER
MUSKARINISCHER REZEPTORTYPEN IN MUSKULARIS
UND MUKOSA DES MAGENS**

MEHSATI HERAWI

1987

Disbui. München





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik II des Klinikums
Großhadern der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. G.Paumgartner

Über die Differenzierung verschiedener
muskarinischer Rezeptortypen in Muskularis
und Mukosa des Magens

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Mehsati Herawi

aus
Teheran

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Paumgartner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Neupert Prof. Dr. G. Hübner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. A. Pfeiffer
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	15. 10. 1987

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einführung	3
1.1 Entstehung des Heterogenitätskonzeptes der Muskarinrezeptoren	3
1.2 Die Differenzierung von M_1 - und M_2 -Rezeptoren	4
1.3 M_2 -Rezeptorsubtypen	7
1.4 Heterogenität der Agonistenbindung	8
1.4.1 Adenylatzyklase und second messenger "cAMP"	9
1.4.2 Phosphodiesterase und second messenger "Inositoltriphosphat"	11
1.4.3 Modulierbarkeit der Muskarinrezeptoren durch Ionen und NEM	12
1.5 Physiologisch relevanter Bindungsaffinitätszustand	13
1.6 Aufgabenstellung dieser Arbeit	14
2. Methodik	15
2.1 Grundlagen	15
2.1.1 Radiorezeptorbindung	15
2.1.2 Radioaktiv markierte Liganden	15
2.1.3 Untersuchungsmaterial	16
2.1.4 Messung der [3H]Ligand-Rezeptor-Bindung	16
2.1.5 Kriterien der spezifischen Bindung	16
2.1.6 Spezifität und Sättigbarkeit	17

2.1.7	Unspezifische Bindung	17
2.1.8	Quantitative Beschreibung der Ligand-Rezeptor-Interaktion	18
2.1.9	Lineare Darstellung der Daten von Sättigungskurven	21
2.1.10	Bestimmung der Bindungseigenschaften eines nicht radioaktiven Liganden	22
2.1.11	Computer-unterstützte Datenauswertung	24
2.1.12	Radio-Rezeptor-Assay mittels Autoradio- graphie von Gewebeschnitten	27
2.1.13	Quantitative Autoradiographie	27
2.2	Experimenteller Teil	29
2.2.1	Herkunft des Gewebes	29
2.2.2	Herstellung des Homogenates aus der Magenschleimhaut	29
2.2.3	Herstellung des Homogenates aus der Magenmuskularis	30
2.2.4	Herstellung der mikroskopischen Gewebeschnitte	30
2.2.5	Vorbehandlung der Objektträger	31
2.2.6	Radio-Rezeptor-Assay	31
2.2.7	Beendigung der Inkubationszeit	33
2.3	Chemikalien	35
2.4	Geräte	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	Bindungsverhalten der Muskarinrezeptoren im Schweinemagen	37
3.1.1	Assoziationsbindungskurve	37
3.1.2	Bindungsverhalten von N-Methylscopolamin	39
3.1.3	Bindungsverhalten von Pirenzepin	43
3.1.4	Bindungsverhalten von Hexahydro-Sila-Di- phenidol	43

3.1.5	Bindungsverhalten von AF-DX 116	46
3.1.6	Bindungsverhalten von Carbachol	47
3.1.7	Einfluß von GppNHp auf die Bindungseigenschaft des Carbachols	48
3.1.8	Einfluß von NEM auf die Bindungseigenschaft des Carbachols	50
3.2	Typisierung der Muskarinrezeptoren im menschlichen Magen	53
3.2.1	Assoziationsbindungskurve	53
3.2.2	Bindungsverhalten von N-Methylscopolamin	53
3.2.3	Bindungsverhalten von Pirenzepin	53
3.2.4	Bindungsverhalten von Carbachol	56
3.2.5	Einfluß von GppNHp auf die Bindungsaffinität von Carbachol	58
3.3	Radio-Rezeptor-Bindung im Mukosa-Gefrierschnitt	60
3.4	Autoradiographische Untersuchung der Magenbiopsien	64
4.	Diskussion	68
4.1	Bindung von [^3H]NMS	69
4.2	Bindung von Pirenzepin	69
4.3	Bindung von Carbachol	72
4.4	Bindung von HHSD und AF-DX 116	77
4.5	Quantitative Autoradiographie der Mukosarezeptoren	80
5.	Zusammenfassung	82
6.	Literaturverzeichnis	84

Abkürzungsverzeichnis

AF-DX 116	Pyridobenzodiazepinon
cAMP	cyclisches (3',5') Adenosinmonophosphat
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (counts per minute)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
4-DAMP	4-diphenidyl-acetoxy-N-methyl piperidin methiodid
DMSO	Dimethylsulfoxid
G (=N)-Proteine	guanosinnukleotidbindendes Protein
$G_s = N_s$	stimulatorisches G-Protein des Adenylatzyklasesystems
$G_i = N_i$	inhibitorisches G-Protein des Adenylatzyklasesystems
$G_o = N_o$	G-Protein mit noch unbekannter Funktion
GppNHp	Guanidylimidodiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämalaun-Eosin
HHSD	Hexahydro-Sila-Diphenidol
IC ₅₀	Konzentration eines Kompetitors, bei dem die Bindung des Radioliganden an Rezeptoren zu 50% verdrängt wird.
K _d	Ausdruck für die Affinität des Liganden für einen Rezeptor
NEM	N-Ethylmaleimid
NMS	N-Methylscopolamin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan

1. Einführung

1.1 Entstehung des Heterogenitätskonzeptes der Muskarinrezeptoren

Die Vorstellung, daß die Wirkung von Pharmaka auf ihre Interaktion mit bestimmten Strukturen der Zelle zurückzuführen ist, geht auf J.N. Langley (1909) und Paul Ehrlich (1913) zurück. Diese Reaktionsorte werden seitdem Rezeptoren genannt.

Die Unterscheidung der muskarinischen von der nikotinischen Wirkung des cholinergen Transmitters "Azetylcholin", die zur Unterteilung des cholinergen Nervensystems in zwei Kategorien führte, gelang etwa zur gleichen Zeit (Dale, 1914).

Muskarinrezeptoren sind weit im Zentralnervensystem, in peripheren autonomen Ganglien, im Herzgewebe, in glatter Muskulatur und im Drüsengewebe beinahe jedes Organs des Körpers verbreitet. Muskarinrezeptoren des Schweinehirnes, die durch Affinitätschromatographie gereinigt wurden, zeigten ein Molekulargewicht von ~70000. (Haga and Haga, 1985).

Mehrere Studien konnten stimulierende und inhibierende muskarinische Wirkungen des Azetylcholins und seiner Analoga in verschiedenen Organen demonstrieren (Burgen, 1984; Birdsall and Hulme, 1983; Hammer and Giachetti, 1982). Die Magensekretion und die gastrointestinale Motilität werden, um ein Beispiel zu geben, durch Azetylcholin stimuliert (Blume et al., 1967; Soll, 1983;

Black and Shankley, 1985). Dagegen wird die Kontraktion des Herzmuskels gehemmt und vaskuläre Muskulatur relaxiert.

Die Entwicklung von Radiorezeptorbindungstechniken, wobei radioaktiv markierte Liganden mit der Rezeptorbindungsstelle interagieren, trugen zur direkten Untersuchung der Rezeptoren wesentlich bei. So konnte gezeigt werden, daß es sich hier um eine sättigbare, reversible und stereoselektive Bindung handelt.

Da eine recht gute Korrelation zwischen den Rezeptorbindungsstudien und den pharmakologisch-physiologischen Studien desselben Gewebes herrscht, gilt die Radiorezeptorbindungsstudie als eine geeignete Methode zur Untersuchung verschiedener Rezeptortypen.

Die Entwicklung dieser Untersuchungstechniken und selektiver Liganden ermöglichte in der letzten Dekade die intensive Untersuchung dieser Rezeptoren (Hammer and Giachetti, 1982; Birdsall and Hulme, 1983). Es konnte gezeigt werden, daß Subklassen der Muskarinrezeptoren sowohl im Zentralnervensystem als auch in peripheren Neuronen und Effektororganen existieren (Birdsall and Hulme, 1983; Hammer et al., 1980; Birdsall et al., 1980; 1984; Hammer, 1982; Hoss, 1985; Hynes et al., 1982; Rimele et al., 1981).

1.2 Die Differenzierung von M_1 - und M_2 -Rezeptoren

Die Klassifizierung der Muskarinrezeptoren in M_1 - und M_2 -Subtypen wurde erstmals basierend auf pharmakologischen Studien des unteren Ösophagussphinkters der Ratte postuliert (Goyal and Rattan, 1978). Die Rezeptoren der inhibitorischen Neurone, deren Stimulation zu einem Druckabfall im Bereich des Sphinkters führt, sind hoch-

affin für McN-A-343, einen potenten selektiven muskarinischen Stimulator der autonomen Ganglien (Roszkowski, 1961). Goyal und Rattan bezeichneten diese Rezeptoren als M_1 . Im Gegensatz dazu wurden die Rezeptoren an den glatten Muskelzellen (Effektororgan), die selektiv durch Bethanechol stimuliert werden, als M_2 -Subtyp bezeichnet. Eine Stimulation der letzteren führt zur Kontraktion der Sphinktermuskularis (Goyal and Rattan, 1978).

Die meisten klassischen muskarinischen Antagonisten binden mit etwa gleicher Affinität die Muskarinrezeptoren unterschiedlichen Gewebes- und Speziesursprungs (Birdsall et al. 1976, 1979). Dies wurde sowohl in den Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien, als auch in pharmakologischen Studien gezeigt. Atropin z.B. hemmt die muskarinische Antwort beinahe aller Gewebe mit derselben Stärke, was seinen therapeutischen Einsatz bei Ulzera wegen erheblicher Nebenwirkungen sehr einschränkt. Diese Beobachtungen zwingen zur Annahme, daß muskarinische Rezeptoren unterschiedlicher Lokalisation sich ähnlich sind.

Im Gegensatz hierzu zeigt "Dibenzodiazepin" (Pirenzepin) einen selektiven antimuskarinischen Effekt. Erst durch die Untersuchung der unterschiedlichen Bindungseigenschaften des Pirenzepins zu den Muskarinrezeptoren wurde die Hypothese der Rezeptorsubtypen bestätigt (Hammer et al., 1980). Pirenzepin (Gastrozepin, LS 519) ist eine zyklische Verbindung, die eine selektive antimuskarinische Eigenschaft besitzt und klinisch zur Behandlung der peptischen Ulzera eingesetzt wird, wobei in therapeutischen Dosen kaum unerwünschte antimuskarinische "Nebenwirkungen" im Vergleich zu den klassischen Antimuskarinika, wie Atropin, auftreten. Diese Substanz kann verschiedene Muskarinrezeptoren durch unterschiedliche Affinität unterscheiden (Hammer et al., 1980; Watson

et al., 1982; 1983; 1984; Gil and Wolfe, 1986). Es wurde demonstriert, daß hochaffine Bindungsstellen für Pirenzepin in bestimmten neuronalen Geweben, wie im zerebralen Cortex und Hippocampus der Ratte und in sympathischen Ganglien lokalisiert sind (M_1). Ihre Affinität liegt im nanomolaren Bereich. Ein weiterer Teil der Rezeptoren mit teilweise neuronaler (Zerebellum, Hypothalamus) und peripherer (Herzmuskulatur, exokrine Drüsen, glatte Muskulatur) Lokalisation zeigt intermediäre bzw. niedrige Affinität für Pirenzepin (Hammer and Giachetti, 1982; Watson et al., 1982; 1983). Diese werden zusammen als M_2 -Rezeptoren bezeichnet.

In manchen Geweben, wie z.B. im Cortex, zeigt Pirenzepin keine einfache Dosis-Wirkungs-Bindungskurve, was auf das Vorhandensein beider Subtypen zurückzuführen ist (Birdsall et al, 1978; 1979). Die Tatsache, daß die Fähigkeit des Pirenzepins Muskarinrezeptoren im Herz und Cortex zu unterscheiden, auch nach einer Solubilisation der Rezeptoren, immer noch erhalten bleibt, deutet darauf hin, daß die Heterogenität der Rezeptoren nicht nur durch den Unterschied ihrer Membranumgebung erklärbar ist, sondern auf unterschiedlichen Rezeptormolekülen beruht (Birdsall et al., 1983).

Die Selektivität des Pirenzepins konnte ebenfalls durch funktionelle Studien erhärtet werden (Hammer and Giachetti, 1984; Mutschler and Lambrecht, 1984; Gilbert et al., 1984; Rattan and Goyal, 1984; Brown et al., 1980; Kilbinger, 1984; Berrie et al., 1985). Diese Daten erlaubten folgende Definition der Muskarinrezeptoren:

1) M_1 -Rezeptoren sind solche, die eine hohe Affinität für den Antagonisten Pirenzepin und den Agonisten McN-A-343 besitzen.

2) M_2 -Rezeptoren sind jene, die eine niedrige Affinität für Pirenzepin und McN-A-343 zeigen.

Kürzlich gelang der Arbeitsgruppe von Numa, die cDNA für den M_1 -Rezeptor zu klonieren. Diese DNA hybridisiert mit RNA vom zerebralen Cortex und Corpus striatum (M_1 -Gewebe), nicht aber mit RNA vom Herzmuskel (M_2 -Gewebe). Somit wurde der erste molekulare Hinweis einer Heterogenität von Muskarinrezeptoren erbracht (Kubo et al., 1986).

1.3 M_2 -Rezeptorsubtypen

Die Untersuchungen der Muskarinrezeptoren in jüngster Zeit ergaben Hinweise für die mögliche Existenz von Subtypen der M_2 -Rezeptoren in verschiedenen peripheren Geweben, die durch neue selektive muskarinische und antimuskarinische Liganden zu unterscheiden sind (Lambrecht and Mutschler, 1985; Hammer et al., 1986), obgleich eine endgültige Subklassifikation bisher noch nicht erfolgt ist.

Mutschler und Lambrecht entwickelten unter anderem muskarinische Antagonisten, die eine höhere Selektivität für ileale M_2 -Rezeptoren zeigen als für kardiale M_2 -Rezeptoren (Lambrecht et al., 1984; Lambrecht and Mutschler, 1984). Diese Antagonisten sind Analoga von antiparkinsonschen Pharmaka, Procyclidin und Silaprocyclidin sowie homologe Verbindungen vom Diphenidol-Typ. Besonders das Silicon-Analog der Diphenidolreihe "Hexahydro-Sila-Diphenidol" ist ein potenter und hochselektiver Antagonist für Muskarinrezeptoren des Ileums (Lambrecht and Mutschler, 1985; Fuder et al., 1985).

In diesem Zusammenhang sollte hier erwähnt werden, daß Barlow und Mitarbeiter bereits 1976 anhand vergleichender Studien von 17 Antagonisten die 15-fache Selektivität des Antagonisten "4-DAMP" für die Rezeptoren des Ileums im

Vergleich zu denen des Herzens zeigen konnten. Demnach postulierten sie die Existenz unterschiedlicher Muskarinrezeptoren in diesen zwei Regionen (Barlow et al., 1976).

Hammer und Mitarbeiter berichteten ebenfalls von einer M_2 -selektiven Substanz: AF-DX 116 ist ein Pirenzepin-Derivat, das eine hohe Affinität für die M_2 -Rezeptoren des Herzens und Zerebellums der Ratte und des Meerschweinchens aufweist. Im Gegensatz dazu zeigen die M_1 -Rezeptoren des zerebralen Cortex eine intermediäre und die M_2 -Rezeptoren der exokrinen Drüsen (glandulae submandibularis, lacrimalis, parotidea) eine sehr niedrige Affinität im mikromolaren Bereich für diese Substanz. AF-DX 116 ist 35-fach höher affin für die M_2 -Rezeptoren des Herzens als für die der exokrinen Drüsen (Hammer et al, 1986). Dieser Affinität nach, die sowohl in Bindungsstudien (Hammer et al., 1986) als auch in pharmakologisch-physiologischen Studien gezeigt wurde (Giachetti et al., 1986), werden kardiale und glanduläre M_2 -Rezeptortypen unterschieden.

1.4 Heterogenität der Agonistenbindung

Im Gegensatz zu den klassischen Antagonisten zeigen die muskarinischen Agonisten heterogene vom Massen-Wirkungs-Gesetz abweichende Bindungskurven. Sie unterscheiden drei Klassen von Bindungsstellen. Diese werden je nach ihrer Affinität für Agonisten "superhigh", "high" and "low" affin (SH, H and L) bezeichnet. Der Anteil eines Gewebes an diesen Bindungsstellen unterscheidet sich von anderen, so daß die Agonistenbindungskurven von Gewebe zu Gewebe verschiedene Formen aufweisen (Birdsall et al., 1978, 1979, 1980; Ehlert et al., 1980; Fields et al., 1978; Hulme et al., 1978; Vauquelin et al., 1982). Im zerebralen Cortex der Ratte z.B. konnte gezeigt werden,

daß mindestens drei Typen der Bindungsstellen (superhigh, high und low affine Bindungsstellen) angenommen werden müssen, um die Agonistenbindungskurven adäquat beschreiben zu können (Birdsall et al., 1980). Obwohl die Bindungseigenschaft der muskarinischen Agonisten im Gehirn plausibel genug durch Annahme unabhängiger Bindungsstellen zu beschreiben sind (Birdsall et al., 1984), ist das "ternary-complex-model" eine allgemein zufriedenstellende Erklärung der Agonistenbindungseigenschaft in den peripheren Geweben, vor allem im Herzgewebe (Ehlert, 1985; Rosenberger et al., 1979; De Lean et al., 1980). Zum näheren Verständnis dieses Modells werden hier erst zwei wichtige Effektorsysteme unter den Muskarinrezeptoren beschrieben.

1.4.1 Adenylatzyklase und second messenger "cAMP" :

Eine Reihe von Transmitterrezeptoren, darunter auch Muskarinrezeptoren (Harden et al., 1985), kontrollieren die Zellantwort über eine Aktivierung (z.B. β -adrenerge Rezeptoren) (Helmreich and Pfeuffer, 1985) bzw. Hemmung der Adenylatzyklase (z.B. Muskarinrezeptoren) (Evans et al., 1985; Jakobs et al., 1980; 1985). Eine Aktivierung führt zu einer Akkumulation des zyklischen AMP (cAMP), das als "second messenger" zur Zellantwort führt. Die Membranrezeptoren wirken nicht direkt auf die Adenylatzyklase, sondern über zwischengeschaltete regulatorische Systeme (GTP-bindende regulierende Proteine), die als Vermittler zwischen katalytischer Einheit, der Adenylatzyklase, und Rezeptor fungieren (Rodbell, 1980; Gilman, 1984; Smigel et al., 1985). Die sogenannten G-Proteine (oder N-Proteine), sind Heterotrimere, d.h. sie bestehen aus drei Untereinheiten α , β und γ (Gilman, 1984; Bokoch et al., 1984). Die G-Proteine unterscheiden sich in ihrer α -Untereinheit (GTP-bindende Untereinheit), nicht aber in der $\beta\gamma$ -Untereinheit (Manning et al., 1983). Das Molekulargewicht der α -Untereinheit der G_{β} -Proteine

beträgt 52000 oder 42000 und das der G_i -Proteine 41000. Diese α -Untereinheiten (α_s und α_i) besitzen GTPase Aktivität und binden GTP und GTP-Analoga. Isoliertes α_s aktiviert direkt die katalytische Einheit. Die β -Untereinheit (35000 MG) beeinflusst diese Einheit nicht. Die Rolle der γ -Untereinheit (5-10,000 MG) ist unbekannt und scheint mit β assoziiert zu sein.

Man stellt sich das "ternary-complex-model" wie folgt vor:

- Der Rezeptor liegt im Komplex mit G_s oder G_i als $\alpha\beta\gamma$ vor.
- Die Besetzung des sowohl stimulierenden (R_s) als auch hemmenden Rezeptors (R_i) durch Hormone verändert die Konformation des Rezeptors so, daß dieser mit dem G-Protein eine Interaktion eingeht.
- Dies bewirkt die GTP-Bindung an α_s bzw. α_i .
- Die GTP-Bindung führt zur Dissoziation der G-Proteine vom Rezeptor und verändert dadurch dessen Affinität.
- Gleichzeitig zerfällt das G-Trimer in α und $\beta\gamma$ -Untereinheiten.
- Die GTP-gebundene α_s -Untereinheit aktiviert nun die Adenylatzyklase (katalytische Einheit).
- Die α -Untereinheit hydrolysiert GTP und ermöglicht eine Reassoziaton von Untereinheiten, $\alpha\beta\gamma$.
- Das β -Unit bindet den Rezeptor, der dadurch eine höhere Affinität für Hormone gewinnt.
- Der Prozeß der Informationsübertragung kann von neuem beginnen. (Northup et al., 1983; Katada et al., 1984; Houslay, 1984).

Das obige Modell wird wesentlich durch Experimente gestützt, die zeigen, daß die Rekonstitution des gereinigten Rezeptors aus dem Schweinehirn mit einem gereinigten G-Protein (G_i oder G_o) zur Bindung eines Rezeptor-G-Protein-Komplexes führt, der eine Guanin-nukleotid-sensitive hochaffine Agonistenbindung zeigt und

dessen GTPase-Aktivität durch Agonisten stimuliert wird (Haga et al., 1985).

Guaninnukleotide modifizieren die Bindungseigenschaft von Muskarinrezeptoren (Katada et al., 1984).

Diese Beeinflußbarkeit der Bindungseigenschaften durch Guaninnukleotide ist ebenfalls in Bindungsstudien mit Membranfraktionen zu beobachten, was die Untersuchung der Rezeptoren im Gewebshomogenat auf dieser Ebene ermöglicht (Hulme et al., 1980).

1.4.2 Phosphodiesterase und second messenger "Inositol-triphosphat":

Bestimmte Neurotransmitter-Rezeptoren im Zentralnervensystem sind an Katabolismus von Inositolipiden in der Zellmembran gekoppelt (Berridge and Irvine, 1984; Berridge, 1984; Irvine et al., 1985; Taylor and Merrit, 1986; Gonzales and Crews, 1985; Brown and Brown, 1982; 1984). Besetzung dieser Rezeptoren durch Agonisten resultiert in der Hydrolyse von Phosphatidylinositol (4,5-bisphosphat) durch Phospholipase C, um Diacylglycerol und Inositoltriphosphat (Inositol 1,4,5-triphosphat und oder Inositol 1,3,4-triphosphat) (Berridge and Irvine, 1984) zu liefern. Diacylglycerol aktiviert die phospholipid- und calciumabhängige (Berridge and Irvine, 1984; Nishizuka, 1984) Proteinkinase C, wobei Inositoltriphosphat ins Zytoplasma freigesetzt wird und als second messenger zur Mobilisierung intrazellulären Ca führt (Berridge and Irvine, 1984). Inositoltriphosphate werden dann durch Hydrolyse von Phosphatgruppen weiter metabolisiert (Berridge and Irvine, 1984).

Der Versuch, verschiedene Signaltransmissionsmechanismen unterschiedlichen Subtypen der Muskarin-

rezeptoren zuzuordnen, resultierte in einer Reihe kontroverser Ergebnisse, die nahelegen, daß eine solche Zuordnung nicht besteht (Fischer and Bartus, 1985). Einige Arbeitsgruppen konnten demonstrieren, daß M_1 -Rezeptoren am Phosphatidylinositol-Umsatz beteiligt sind (Akiyama et al., 1986), andere wiederum brachten Hinweise dafür, daß M_2 -Rezeptoren über denselben Mechanismus zur Zellantwort führen (Brown and Brown, 1982; Pfeiffer et al., 1986; Brown et al., 1985).

1.4.3 Modulierbarkeit der Muskarinrezeptoren durch Ionen und NEM

Die Bindungseigenschaften von Agonisten zu Muskarinrezeptoren werden durch Ionen, wie Mg^{2+} und Na^+ (Birdsall et al., 1979; Ehlert et al., 1980; Rosenberger et al., 1980) sowie Sulfhydryl-Reagenzien beeinflusst (Aronstam et al., 1978; Aronstam and Eldefrawi, 1979; Nukada et al., 1983). Besonders NEM, welches seine Wirkung aufgrund Alkylierung der SH-Gruppen entfaltet, beeinflusst die Bindungseigenschaft der muskarinischen Subtypen unterschiedlich. Dies wurde von einigen Arbeitsgruppen als Hilfsmittel zur Unterscheidung der Rezeptorsubtypen verwendet. Die NEM-Wirkung ist temperatur- und konzentrationsabhängig. Niedrige Konzentrationen von NEM vermindern ähnlich dem GTP oder seinem stabilen Analogon GppNHp die Affinität der M_2 -Rezeptoren des Herz- und Hirnstammgewebes für Carbachol (Korn et al., 1983; Harden et al., 1982). Parallele Effekte von GppNHp und NEM wurden ebenfalls für α -adrenerge Rezeptoren, Dopaminrezeptoren und Opiatrezeptoren beobachtet (Jakobs et al., 1982; Suen et al., 1982; Mullikin-Kilpatrick et al., 1983).

NEM-Konzentrationen von 1mM und höher zeigen eine entgegengesetzte Wirkung. Sie steigern die Affinität der Agonisten für Muskarinrezeptoren einiger Gewebe (Aronstam and Eldefrawi, 1979; Ikeda et al., 1980). Die Ursache liegt in einer Konformationsänderung, wobei weiter

gezeigt werden konnte, daß NEM eine Zunahme der SH-Gruppen verursacht (Ehlert et al., 1981). Flynn und Potter demonstrierten ebenfalls eine Linksverschiebung der M_2 -Bindungskurve im Hirnstamm bei einer Behandlung der Membranpräparation mit höheren Konzentrationen von NEM, während die M_1 -Rezeptoren im Hippocampus unbeeinflusst blieben (Flynn and Potter, 1985). Diese Linksverschiebung wird von einigen Arbeitsgruppen als ein Hinweis auf die Zunahme des hochaffinen Bindungszustandes angesehen, der allosterisch durch Alkylierung der SH-Gruppen erzeugt wird (Aronstam et al., 1978). NEM scheint den "ternary-complex" des Agonist-Rezeptor-G-Protein zu stabilisieren (Heidenreich et al., 1982; Korner et al., 1982).

1.5 Physiologisch relevanter Bindungsaffinitätszustand

Ein Vergleich der Rezeptor-Bindungsstudien mit pharmakologischen Funktionsstudien derselben Gewebe läßt vermuten, daß die niederaffine Agonistenbindungsstelle (L) des Rezeptors physiologisch relevant ist, wie es z.B. im Meerschweinchen-Ileum gezeigt werden konnte (Birdsall et al., 1977). Eine ähnliche Korrelation wurde in biochemischen Reaktionen der Gewebe beobachtet, die mit großer Wahrscheinlichkeit an muskarinische Rezeptoren gekoppelt sind: Stimulation der zyklischen GMP-Bildung in Striatum-Schnitten (Hanley and Iversen, 1978) und Hemmung der GTP-abhängigen Adenylatzyklase-Aktivität im Herzmuskel-Homogenat (Birdsall et al., 1980a) korrelieren allgemein mit der Agonistenbesetzung der niederaffinen Rezeptorbindungsstelle. Carbachol und Oxotremorin bewirken in menschlichen Astrocytom-Zellen eine Hemmung der cAMP-Akkumulation, die durch Isoproterenol bewirkt wurde (Meeker and Harden, 1982). Auch hier herrscht eine Übereinstimmung zwischen dem K_i -Wert, erforderlich für

die Wirksamkeit, und der Bindung von Carbachol und Oxotremorin an Rezeptorenbindungsstellen von niederaffinem Typ.

1.6 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe von Radiorezeptorbindungsstudien

1. die Muskarinrezeptoren der Mukosa und benachbarter Muskularis am Modell des Schweinemagens klassifiziert werden, wobei besonders die Frage einer weiteren Subtypisierung der M_2 -Rezeptoren untersucht wurde.
2. die Muskarinrezeptoren der Mukosa und Muskularis des menschlichen Magens typisiert und mit obigen Daten verglichen werden.
3. die Anwendbarkeit der Autoradiographie als Methode zur Quantifizierung der Muskarinrezeptoren in dem menschlichen Magen entnommenen Schleimhautbiopsien untersucht werden.

2. Methodik

2.1 Grundlagen

2.1.1 Radiorezeptorbindung

Das Prinzip der Ligand-Rezeptor-Bindungsmessung besteht in der Bindung der radioaktiv markierten Agonisten oder Antagonisten an Erkennungsstellen der Rezeptoren. Die Menge der gebundenen Radioaktivität ermöglicht eine Berechnung der Bindungsaffinität sowie der Menge der vorhandenen Rezeptorbindungsstellen im Untersuchungsmaterial. Da die Menge der Rezeptoren in den meisten Geweben im femto- bis picomolarem Bereich / mg Feuchtgewebe liegt (Levitzki, 1984), muß ein brauchbarer markierter Ligand folgende Eigenschaften besitzen:

- (1) Hohe Affinität: Die Dissoziationskonstante soll im Bereich der Rezeptorkonzentration liegen.
- (2) Hohe Selektivität: Der Ligand soll möglichst nur eine Rezeptorpopulation binden.
- (3) Hohe spezifische Radioaktivität: Eine genaue Messung der Radioaktivität soll trotz Verwendung kleiner Mengen des Liganden (im femtomolaren Bereich) möglich sein.

2.1.2 Radioaktiv markierte Liganden

Die meist verwendeten Isotope zur Markierung von Liganden sind ^3H , ^{125}J , ^{32}P und ^{14}C . Tritium wird häufig dem ^{125}J vorgezogen, da es in das Ligandenmolekül eingebaut werden kann, ohne dessen

biologische Eigenschaften zu verändern, so daß kein Unterschied zwischen markiertem und nicht markiertem Ligand besteht. Außerdem braucht der Ligand wegen der langen Halbwertszeit des Tritiums (12,5 Jahre) nicht häufig resynthetisiert zu werden, wie dies beim ^{125}J -markierten Liganden der Fall ist (Limbird; 1986).

2.1.3 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial, mit dem der Radioligand inkubiert wird, kann in Form "intakter Zellen", "isolierter Rezeptoren", "Gewebehomogenaten", isolierter Membranfraktionen oder Gewebeschnitte verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen durch Zentrifugation aus homogenisiertem Gewebe Membranfraktionen angereichert und zum anderen Kryotomschnitte angefertigt, die dann mit tritiiertem Liganden inkubiert wurden.

2.1.4 Messung der [^3H]Ligand-Rezeptor-Bindung

Zur Trennung des gebundenen vom freien Radioliganden werden häufig Filtrations- bzw. Zentrifugationstechniken verwendet. Diese Methoden setzen die Inkubation des Untersuchungsmaterials in Form von Gewebshomogenat mit radioaktiv markiertem Liganden voraus. Der membrangebundene Ligand wird anschließend durch Filtration oder Zentrifugation des Reaktionsgemisches vom freien Liganden getrennt.

2.1.5 Kriterien der spezifischen Bindung

Der radioaktiv markierte Ligand vermag prinzipiell außer der Rezeptorbindungsstelle jede andere in der Präparation vorkommende Komponente zu binden, was als "unspezifische Bindung" bezeichnet wird. Um zu versichern, daß der gebundene Teil tatsächlich dem

physiologisch relevanten Rezeptor entspricht, wird die Erfüllung folgender Kriterien der Bindung gefordert: "Sättigbarkeit", "Spezifität" und "Reversibilität" der Bindung.

2.1.6 Spezifität und Sättigbarkeit

Da die Anzahl spezifischer Bindungsstellen bzw. Rezeptormoleküle in einer Präparation begrenzt ist, sollte folglich auch die Menge des spezifisch bindenden Liganden begrenzt sein. Zur Untersuchung dieses Kriteriums werden die Bindungscharakteristika als eine Funktion steigender Radioligandenkonzentrationen ermittelt (Sättigungskurve). Bindet der Radioligand eine sättigbare Rezeptorpopulation, die ihrerseits lediglich eine einzige Affinität für diesen Liganden aufweist, ergibt sich eine Kurve, die ab einem bestimmten Bereich die Form eines Plateaus annimmt, wenn die gebundene gegen die freie Ligandenkonzentration aufgetragen wird.

2.1.7 Unspezifische Bindung

Im Gegensatz zur spezifischen ist die unspezifische Bindung nicht sättigbar und nimmt als eine Funktion der steigenden Radioligandenkonzentration linear zu. Sie wird als diejenige Bindung bezeichnet, die in Gegenwart überschüssiger Konzentrationen des unmarkierten Liganden gemessen wird.

Da nach dem Massen-Wirkungs-Gesetz eine Kompetitorkonzentration von $10 \times K_d$ beinahe vollständig alle vorhandenen spezifischen Rezeptorbindungsstellen besetzt, stellt eine Konzentration von $> 100 \times K_d$ einen Überschuß dar, der den Radioliganden vollständig von seiner spezifischen (sättigbaren) Bindungsstelle zu verdrängen vermag. Dies allerdings setzt voraus, daß der Radioligand in einer Konzentration $< K_d$ (des Radioliganden) verwendet

wird und der Kompetitor eine einfache bimolekulare Reaktion mit der Rezeptorbindungsstelle eingeht.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der unspezifischen Bindung stellt der Zusatz steigender Konzentrationen des Kompetitors (unmarkierter Ligand) zu der Präparation in Gegenwart einer fixen Konzentration des Radioliganden dar. Wird der Rezeptor-Ligand-Komplex gegen $\log_{10}$ (Kompetitor) aufgetragen, erreicht die Abnahme der Radioligandenbindung als eine Funktion der steigenden Kompetitorkonzentrationen in Abhängigkeit der Bindungsaffinität ihr Maximum, welches in Form eines Plateaus zu erkennen ist. Die Konzentration des Kompetitors, bei der die Bindungskurve der Abszisse gegenüber asymptotisch wird, stellt das Maß für die unspezifische Bindung dar.

Dieses Verfahren bleibt auch im Falle mehrerer Bindungsstellen anwendbar (Limbird, 1986).

2.1.8 Quantitative Beschreibung der Ligand-Rezeptor-Interaktion

Basierend auf dem Massen-Wirkungs-Gesetz, läßt sich die Interaktion eines Liganden mit einer spezifischen Rezeptorbindungsstelle im Gleichgewichtszustand von Hin- und Rückreaktion folgendermaßen darstellen:



wobei $[L]$ die Konzentration des freien Liganden, $[R]$ die Konzentration der nicht besetzten Bindungsstellen und $[LR]$ die Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes darstellt.

K_1 ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Assoziation und K_2 ein Maß für die Geschwindigkeit der Dissoziation,

wobei im Gleichgewichtszustand folgendes gilt:

$$K_1 \times [L] \times [R] = K_2 \times [LR] \quad (2)$$

Das Verhältnis des gebundenen Liganden (LR-Komplex) zu den nicht gebundenen Teilen (L und R) kann wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{[L] \times [R]}{[LR]} = \frac{K_2}{K_1} = K_d, \text{ molar} \quad (3)$$

Wobei K_d die Dissoziationskonstante im Gleichgewichtszustand darstellt. Die Ermittlung des K_d -Wertes wird einfachheitshalber der des K_a -Wert (Assoziationskonstante) vorgezogen, da seine Einheit in Molar ausgedrückt wird (Limbird, 1986). K_d repräsentiert diejenige Ligandenkonzentration, bei der die Hälfte der in der Präparation vorkommenden Rezeptorbindungsstellen im Gleichgewichtszustand vom Radioliganden gebunden wurden.

Der K_d -Wert ist ein Ausdruck der Affinität des Liganden für seinen Rezeptor. Eine Zunahme des K_d -Wertes entspricht einer Abnahme der Affinität.

Nach der Definition der spezifischen Bindung ist die Anzahl an Bindungsstellen limitiert und im gesättigten Zustand beinahe vollständig vom Liganden besetzt. Dies kann folgendermaßen zum Ausdruck gebracht werden:

$$B_{\max} = [R] + [LR] \quad (4)$$

oder

$$B_{\max} \times [L] = ([LR] + [R]) \times [L] \quad (5)$$

Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung 3 ein, folgt:

$$B_{\max} \times [L] = [RL] \times [L] + [LR] \times K_d \quad (6)$$

oder

$$[RL] = \frac{B_{\max} \times [L]}{[L] + K_d} \quad (7)$$

Stellt B den gebundenen Liganden [LR] und F den freien Liganden [L] dar, ergibt sich:

$$B = \frac{B_{\max} \times F}{F + K_d} \quad (8)$$

beziehungsweise

$$B_{\max} \times F = BF + B \times K_d \quad (9)$$

Wird diese Gleichung durch die Größe F dividiert:

$$B_{\max} = B + \frac{B}{F} \times K_d \quad (10)$$

Diese kann folgendermaßen beschrieben werden:

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\max} - B}{K_d} \quad (11)$$

Dies stellt die Scatchardgleichung (1949) dar, die eine graphische Ableitung der Bindungseigenschaften K_d und $B_{\max}$ erlaubt.

2.1.9 Lineare Darstellung der Daten von Sättigungskurven

Bei der Darstellung nach Scatchard wird $[LR] / [L]$ auf der Ordinate gegen $[LR]$ auf der Abszisse, bzw. B / F gegen B aufgetragen ($B = [LR]$ = gebundener Ligand "bound" und $F = [L]$ = freier Ligand "free").

Wirkt ein einziger Ligand mit einer einzigen Population an Rezeptoren zusammen, ergibt sich die Darstellung in Form einer Geraden, deren Steigung den Wert $-1/K_d$ bzw. $-K_a$ darstellt.

Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse bezeichnet die maximale Anzahl der Bindungsstellen $B_{\max}$.

Wenn steigende Radioligandenkonzentrationen verwendet werden, sollte der Konzentrationsbereich 10-fach unterhalb des K_d anfangen und 10-fach oberhalb des K_d aufhören. Falls eine konstante Konzentration des markierten Liganden verwendet wird, erhält man die besten Schätzwerte für die Parameter K_d und $B_{\max}$, wenn die verwendeten Konzentrationen des markierten Liganden im Bereich bzw. etwas unterhalb des K_d -Wertes liegen. Zu niedrige Konzentrationen führen zur Ermittlung niedriger Werte dieser Parameter, und zu hohe Konzentrationen ergeben zwar eine genaue $B_{\max}$ aber eine zu hohe K_d .

Einschätzung (Williams and Lefkowitz, 1978).

2.1.10 Bestimmung der Bindungseigenschaften eines nicht radioaktiven Liganden

Hierbei erfolgt die Inkubation des Untersuchungsmaterials, dessen Bindungseigenschaften bekannt sind, mit einer konstanten Radioligandenkonzentration in Gegenwart steigender Konzentrationen eines nicht markierten Kompetitors (Agonist bzw. Antagonist).

Die experimentell ermittelten Bindungsdaten werden als % spezifische Bindung gegen $\log_{10}$ (Kompetitor) aufgetragen. Dabei wird untersucht, in welchem Maß sich der markierte Ligand durch steigende Konzentrationen eines Kompetitors aus seiner Bindungsstelle verdrängen läßt. Die Konzentration des Kompetitors, bei welcher die Bindung des Radioliganden zu 50% verdrängt wird, stellt ein Maß für den IC_{50} des nicht markierten Liganden dar, vorausgesetzt, daß der Kompetitor und der markierte Ligand in gleicher Weise mit der Bindungsstelle interagieren.

Der errechnete IC_{50} -Wert in Verdrängungsexperimenten ist dem K_d -Wert des Kompetitors nicht gleichzusetzen und hängt von der Konzentration und der Affinität des Radioliganden (L) ab. Unter den oben definierten Bedingungen kann der K_d -Wert des Kompetitors anhand des ermittelten IC_{50} -wertes durch Anwendung der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) errechnet werden:

$$IC_{50} = K_d \times 1 + [L] / K_{dL}$$

oder

$$K_d = \frac{IC_{50}}{1 + [L] / K_{dL}}$$

Wobei K_d = Dissoziationskonstante des Kompetitors im Gleichgewichtszustand und

K_{dL} = Dissoziationskonstante des Radioliganden (L) im Gleichgewichtszustand

Hierbei wird vorausgesetzt, daß $[R] \ll K_d$ des Radioliganden ist.

Weiter kann man anhand der Steigung der Verdrängungskurve ermitteln, ob der Kompetitor mit der Bindungsstelle eine einfache, dem Massen-Wirkungs-Gesetz gehorchende, oder eine komplexe Bindung eingeht. Ist die Ligand-Rezeptor-Bindung eine einfache bimolekulare Reaktion, dann nimmt die spezifische Bindung in einer Spanne von 81-facher KompetitorKonzentration von 90% auf 10% ab (Koshland, 1970). In diesem Fall zeigt die Kurve eine Steigung, die charakteristisch für reversible bimolekulare dem Massen-Wirkungs-Gesetz gehorchende Reaktionen ist.

Vergleichend dazu können die Verdrängungskurven eine flache oder steile Form zeigen. Flache Kurven deuten auf folgende mögliche Phänomene hin :

(1) Es existieren multiple unabhängige Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten für den Liganden, so daß der Ligand erst die hochaffine Population besetzt und erst dann die Bindung an die niederaffine Population erfolgt.

(2) Es existieren multiple Affinitätszustände eines Rezeptors als ein Phänomen der Rezeptor-Effektor-Kopplung, wobei z.B. ein Teil der gesamten Rezeptormenge mit einem G-Protein assoziiert ist und den hochaffinen Bindungszustand repräsentiert. Der weitere Teil aber zeigt eine niedrige Bindungsaffinität für den Liganden, z.B. durch

Dissoziation des Rezeptors vom G-Protein.

(3) Es existiert die sog. "negative Kooperativität", so daß die Affinität der Rezeptorpopulation mit einer Zunahme der Rezeptorbesetzung abnimmt.

Die Charakterisierung von verschiedenen Rezeptor-subtypen in einer Membranpräparation wird meist anhand der Analyse von Verdrängungskurven durchgeführt, bei denen der Radioligand für alle vorhandenen Bindungsstellen dieselbe Affinität besitzt, der Kompetitor aber nur für eine Bindungspopulation eine hohe Affinität zeigt.

2.1.11 Computer-unterstützte Datenauswertung

Zur Auswertung der Radioligand-Bindungsstudien stehen Computerprogramme zur Verfügung, die auch komplexere Bindungsphänomene zu analysieren vermögen. Hierbei angewandte Computerprogramme können in zwei Kategorien eingeordnet werden: nicht restriktiv und restriktiv.

Das nicht restriktive Modell ist auf einer logarithmischen Basis mit vier Parametern aufgebaut und entspricht mathematisch der Hill-Gleichung (De Lean et al., 1978). In diesem Modell gilt die Gleichung:

$$y = \frac{a-d}{1+(x/c)^b} + d$$

wobei

y = Konzentration der Radioligandbindung

x = Konzentration der Kompetitorbindung

c = IC₅₀ des Kompetitors

d = obere Grenze für y (entspricht der totalen Bindung)
 a = untere Grenze für y (entspricht der unspezifischen Bindung)
 b = Steigung der Kurve

Das Programm "ALLFIT", das auf diesem Modell basiert, wird allgemein zur Auswertung einer Reihe von Verdrängungskurven, die mit verschiedenen nicht markierten Kompetitoren durchgeführt werden, verwendet (De Lean et al., 1978).

Die experimentell gewonnenen Daten werden durch das Programm nach den Reziproken der Varianz gewichtet, wobei die Bindungskurve an diejenigen Daten stärker angelegt wird, die die größte Genauigkeit aufweisen. Die unspezifische Bindung wird basierend auf den Charakteristika aller experimentellen Daten der Verdrängungskurve ermittelt, was einer willkürlich definierten Bestimmung vorzuziehen ist.

Das Programm erlaubt, jede Verdrängungskurve einzeln zu betrachten oder alle Kurven gemeinsam zu analysieren und zu vergleichen.

Im letzteren Fall kann man einen bestimmten Parameter z.B. den Parameter IC_{50} aber auch mehrere Parameter gleichzeitig z.B. IC_{50} und Steigung der Kurve unter den zu vergleichenden Kurven als identisch festlegen und statistisch die Güte der Datenanalyse ohne und mit dieser Festlegung prüfen. Somit kann man untersuchen, ob verschiedene Liganden auf eine ähnliche Weise mit dem Rezeptor interagieren.

Um den Verdrängungskurven weitergehende Information abzugewinnen als das Programm "ALLFIT" zu liefern vermag, sind andere Computerprogramme entwickelt worden.

Das Programm "LIGAND" (Munson und Rodbard, 1980; Munson 1983) ist zur Beschreibung komplexer Bindungsphänomene entwickelt worden und beruht auf dem erweiterten

Massen-Wirkungs-Gesetz. Mathematisch wird ein " $N \times M$ " Modell für N Liganden, die an M Klassen von Rezeptor-bindungsstellen binden (Feldman, 1972), verwendet.

Diese Beziehung kann zur Beschreibung zweier Formen der experimentellen Daten verwendet werden:

(1) Sättigungsbindungsdaten, wobei die Rezeptorpopulation durch den Radioliganden steigender Konzentrationen besetzt wird und

(2) Verdrängungsbindungsdaten, wobei der Rezeptor mit einer fixen Radioligandenmenge und unterschiedlichen Konzentrationen des Kompetitors interagiert. Hierbei werden Schätzwerte für K_d und B_{max} ermittelt.

Ähnlich dem Programm "ALLFIT" wird hier eine Modellkurve nach dem Massen-Wirkungs-Gesetz (nach der Methode der "kleinsten quadratischen Abweichungen") den Meßdaten angepaßt. Die Abweichung der Punkte von der Modellkurve wird als Maß für die Qualität der Kurvenanpassung verwendet. Hierbei erfolgt wiederum eine Wichtung der Punkte nach der zu erwartenden Varianz.

Praktisch geht man so vor, daß bei der Analyse der Bindungskurve nacheinander ein Modell für lediglich eine Klasse der Bindungsstellen und ein Modell für zwei Bindungsstellen an die Meßdaten angepaßt wird. Die Qualität der Kurvenanpassung dieser Modelle wird auf der Basis eines "Run-Tests" und des Vergleiches der mittleren quadratischen Abweichungen der Meßwerte von der Kurve mit Hilfe eines F-Tests ermittelt.

2.1.12 Radio-Rezeptor-Assay mittels Autoradiographie von Gewebeschnitten.

Die Entwicklung autoradiographischer Techniken zur Rezeptorbestimmung in Gewebeschnitten (Young and Kuhar, 1979) sowie die Einführung tritiumsensitiven Films (Palacios et al., 1981; Penny et al., 1981; Rainbow et al., 1982; Unnerstahl et al., 1982) führten zu einer neuen eleganten Weise der Rezeptorforschung, bei der man mit nur wenig Untersuchungsmaterial arbeiten kann. Insbesondere durch die technische Entwicklung von Vorrichtungen zur densitometrischen Analyse des Autoradiogramms wurde die quantitative Autoradiographie zu einem aussagekräftigen Mittel in der Rezeptorforschung.

Das Verfahren der radioaktiven Markierung von Rezeptoren im Gewebeschnitt zur quantitativen Autoradiographie (QAR) ist der Gewebshomogenattechnik ähnlich (Bennett und Yamamura, 1985). Im allgemeinen werden Kryotomschnitte auf Objektträgern mit dem Radioliganden inkubiert und anschließend radiosensitivem Film exponiert. Die β -Strahlung des gebundenen Radioliganden führt zur Schwärzung des Silbergranulats in der Photoemulsion. Diese Schwärzung kann mit Hilfe eines Densitometers analysiert werden. Da Tritium ein schwacher β -Strahler ist, wird der Schwärzungsgrad der Photoemulsion durch Unterschiede in der Schnittdicke nicht beeinflusst.

2.1.13 Quantitative Autoradiographie

Die quantitative Auswertung von Autoradiogrammen erfolgt durch:

- (1) Messung des Schwärzungsgrades der Photoemulsion,
- (2) Auszählen der Silbergranula pro Flächeneinheit.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Messung des Schwärzungsgrades der Photoemulsion anhand eines

Mikroskop-Densitometers verwendet. Dazu wurde das Autoradiogramm auf einen Bildschirm projiziert, und die ausgewählte Region anhand eines Stiftes auf dem Bildschirm markiert. Die Lichtmenge, die durch diese Region absorbiert wurde und die photosensible Zelle erreichte, wurde automatisch vom Hintergrund abgezogen und ermittelt. Der Hintergrund wird definiert als die Schwärzung der Photoemulsion, die durch natürliche Strahlung erzeugt wird.

2.2 Experimenteller Teil

2.2.1 Herkunft des Gewebes

A) Schweinemägen wurden vom Münchner Schlachthof geholt. Die Mägen wurden unter fließendem Leitungswasser gesäubert und in Ringerlösung auf Eis transportiert. Der Corpusbereich wurde mit Hilfe eines Skalpells herauspräpariert, der Schleim mit Hilfe eines Objektträgers von der Mukosaoberfläche abgetragen, die Mukosa- von der Muskularis-Schicht abgetrennt, beide Regionen in Stücke geschnitten, in Plastikgefäße überführt und innerhalb zwei Stunden post mortem im Gefrierschrank bei -70°C eingefroren.

B) Die Magengewebe menschlicher Herkunft, wurden von der chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern zur Verfügung gestellt. Sie waren makroskopisch unauffällig und entstammten Patienten, die wegen Ulzera oder Karzinomen am Magen operiert worden waren. Die Gewebestücke wurden schnellstmöglich bei -70°C tiefgefroren.

C) Biopsien der menschlichen Magenschleimhaut wurden bei Routineuntersuchungen der Med. Klinik II entnommen, sofort nach Entnahme auf Trockeneis eingefroren und bis zur Untersuchung bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2 Herstellung des Homogenates aus der Magenschleimhaut

Das Gewebe wurde auf Eis aufgetaut, die Mukosa mit Hilfe eines Skalpells abgekratzt, abgewogen und in der zehnfachen Gewichtsmenge mit isotonem eisgekühltem

Saccharose-TRIS/HCL Puffer (0,32 M Saccharose; 0,05 M TRIS/HCL Puffer; pH 7,5) mit Hilfe eines Glas-Teflon-Homogenisators (Potter Elvehjem) homogenisiert, indem das Gefäß bei Stufe 5 zehnmal auf und ab bewegt wurde. Das erhaltene Homogenat wurde durch zweischichtige Gaze filtriert und anschließend zweimal bei 4°C zentrifugiert, erst 10 Minuten lang bei 500g, um Schleim und Debris zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand 30 Minuten lang bei 49000g (20000 rpm) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in TRIS/HCL Puffer (0,05 M, pH 7,5) mit Hilfe eines Ultra-Turrax bei Stufe 6, 10 Sekunden lang resuspendiert und bei inkompletter Resuspension der Vorgang 5 Sekunden lang wiederholt.

2.2.3 Herstellung des Homogenates aus der Magenskularis

Die Muskularis wurde auf Eis aufgetaut, mit einer Schere in feine Stücke geschnitten, abgewogen und in Saccharose-TRIS/HCL Puffer mit Hilfe eines Ultra-Turrax bei Stufe 7-8, 2 mal 10 Sekunden lang homogenisiert. Das Homogenat wurde dreimal durch einschichtige Gaze filtriert und genau wie zuvor beschrieben zweimal zentrifugiert und das entstandene Pellet in TRIS/HCL Puffer mit Hilfe des Ultra-Turrax bei Stufe 6, 10 Sekunden lang resuspendiert.

2.2.4 Herstellung der mikroskopischen Gewebeschnitte

Das Mukosagewebe wurde auf Eis aufgetaut und daraus ein etwa 1qcm großes Stück herausgeschnitten. Das Stück wurde dann auf einen in Trockeneis gelagerten Schneideblock in einer Schicht 12%iger Gelatinelösung so eingebettet, daß die Schnitte entlang der Magendrösen (Glandula gastricae) gelegt werden konnten. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Kryotoms bei -20°C 20 µm dick geschnitten, auf vorbehandelte Objektträger

aufgetragen und auf Eis gelagert bis der Vorgang des Schneidens beendet war.

Die Schnitte wurden dann unter Vakuum eine Stunde lang getrocknet und anschließend entweder sofort verwendet oder in Histologieschachteln vakuumverpackt, bei -70°C bis zum Gebrauch aufbewahrt, wobei diese Zeitspanne drei Wochen nicht überschritt.

Die Biopsien wurden genau wie oben beschrieben verarbeitet mit dem Unterschied, daß sie ganz in Gelatine eingebettet wurden.

Da es bei den Biopsien makroskopisch nicht möglich war, die Verlaufsrichtung der Glandulae gastricae festzustellen, wurden nach Auftragung von 8 Biopsieschnitten auf einen Objektträger 7-20 μm dicke Schnitte zur Färbung angefertigt. Diese wurden nach HE gefärbt und später mit den Autoradiogrammen derselben Biopsie und demselben Schnittniveau verglichen.

2.2.5 Vorbehandlung der Objektträger

Dies erfolgte dadurch, daß die Objektträger kurz in eine Lösung aus 0,5% Gelatine und 0,05% Chrom-Natrium-Sulfat bei Raumtemperatur eingetaucht und anschließend über Nacht getrocknet wurden.

2.2.6 Radio-Rezeptor-Assay

Die Membranfraktionen wurden wie zuvor beschrieben am Versuchstag hergestellt. Das Pellet wurde mit TRIS/HCL Puffer resuspendiert. Die Bindungsreaktion wurde in Doppelt- bzw. Dreifachbestimmungen in Polypropylen-reagenzröhrchen ($\varnothing$ 1cm; Länge 5 cm) in einem Volumen von 1 ml durchgeführt.

Die Kryotomschnitte wurden wie vorher beschrieben angefertigt. Diejenigen, die im Gefrierschrank bei -70°C

aufbewahrt waren, wurden erst nachdem die Verpackung die Raumtemperatur erreicht hatte geöffnet. Die Bindungsreaktion wurde in dreifachem Ansatz durchgeführt.

Die Konzentration des markierten Liganden ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) betrug für alle Verdrängungs- und Assoziations-Bindungsexperimente 0,25 und für die Sättigungsexperimente 0,05-3 nM.

Die Konzentration des nicht markierten Liganden betrug je nach Liganden 10^{-11} bis 10^{-2} M.

Die unspezifische Bindung wurde durch Zusatz einer hohen Konzentration (10^{-6} oder 10^{-5} M) von nicht radioaktiv-markiertem Atropin bzw. NMS bestimmt.

Bei Verdrängungsstudien wurde in den mit Schweinemägen durchgeführten Experimenten immer eine zusätzliche Verdrängungskurve von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durch nicht markiertes NMS ausgeführt, um die Affinität des Radioliganden unter verschiedenen Bedingungen möglichst genau zu ermitteln.

Alle Verdünnungen, sowohl der Liganden als auch des Homogenates, erfolgten in hypotonem TRIS/HCL Puffer (pH 7,5; 50 mM).

In einigen Versuchen wurde dem Inkubationsmedium GppNHp (0,1 mM) zugesetzt. In manchen Experimenten wurde dem Gewebshomogenat nach dem ersten Zentrifugationsschritt NEM (1 mM) hinzugefügt. Der zweite Zentrifugationsschritt erfolgte nach einer NEM-Wirkungszeit von 30 Minuten (Siehe Teil "Ergebnisse").

Bei den Experimenten mit Kryotomschnitten wurde die sogenannte Tropfen-Technik angewendet (Nakada et al., 1984), bei der ein Radioligand enthaltender Inkubationspuffer in Volumina von 30-100 μl so auf die Gefrierschnitte pipettiert wird, daß eine vollständige Bedeckung derselben erfolgt.

Diese Technik ist bezüglich der verwendeten Radio-

ligandenmenge vorteilhafter als wenn die Objektträger nach der klassischen Methode in einen Behälter mit Radioligand-Puffer eingetaucht werden.

Nach einer Inkubationszeit von 35 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur (23-25°C) erreichte die Bindungsreaktion mit dem Mukosa- und Muskularishomogenat bzw. mit den Kryotomschnitten den Gleichgewichtszustand.

2.2.7 Beendigung der Inkubationszeit

Gewebehomogenat

In den mit dem Gewebehomogenat durchgeführten Experimenten wurde zur Trennung des gebundenen vom freien Radioligand die "Vakuumfiltrationsmethode" gewählt, die die Verarbeitung einer großen Anzahl von Proben ermöglicht.

Dazu wurde das Reaktionsgemisch jedes einzelnen Reagenzröhrchen mit 3 ml eiskaltem TRIS/HCL Puffer verdünnt und anschließend sofort durch Glasfaserfilter (WHATMAN GFC) filtriert. Diese Filter sind so beschaffen, daß sie alle Membranteile zurückhalten und kaum Radioligand absorbieren. Da NMS eine hohe Affinität zu den Muskarinrezeptoren hat, wurden die Filter zweimal mit jeweils 3ml eiskaltem Puffer gewaschen, um den freien Radioligand zu entfernen. Die Dauer der Filtration pro Pufferwaschgang betrug nicht länger als 5 Sekunden. Die Zeit des gesamten Filtrationsvorganges betrug je nach Anzahl der Proben zwischen 3 bis 6 Minuten.

Gefrierschnitte

Die Inkubationszeit wurde durch das Waschen von Objektträgern in frischem eiskaltem Puffer beendet. Dazu

wurden die Objektträger 5mal jeweils für eine Minute in einen neuen Behälter mit frischem Puffer eingetaucht. Zweck des Waschens ist, möglichst vollständig den überschüssigen nicht gebundenen Radioliganden zu entfernen und damit eine hohe spezifische Bindung zu erzielen.

Nach der Beendigung des Waschvorganges wurden die Objektträger abgetropft und die Gewebeschnitte an der Luft vollständig getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger in der Dunkelkammer bei Rotlicht in eine Röntgenfilmkassette eingelegt und mit einem tritiumsensitiven Film bedeckt. Die Präparate wurden dann bei Raumtemperatur 4 Monate lang exponiert.

Nach beendeter Expositionszeit wurde der Film in der Dunkelkammer von den Objektträgern abgenommen und nach der Reihenfolge:

- Entwicklung
 - Waschen im dest. Wasser
 - Fixierung
 - Waschen im dest. Wasser
 - Lufttrocknen
- behandelt.

2.3 Chemikalien

- [^3H]N-Methylscopolamin (80 Ci/mMol) von New England Nuclear (Dreieich)
- Pirenzepin (Gastrozepin), ein M_1 selektiver Antagonist, wurde freundlicherweise von Dr. Hammer zur Verfügung gestellt.
- Hexahydro-Sila-Diphenidol, ein M_2 selektiver Antagonist, wurde freundlicherweise von Prof. Mutschler und Prof. Lambrecht (Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt.
- AF-DX 116, ein M_2 selektiver Antagonist, wurde von Thomae (Biberach a.d. Riss) zur Verfügung gestellt.
- Carbachol, ein klassischer muskarin. Agonist, und
- N-Methylscopolamin, ein klassischer muskarin. Antagonist, und
- N-Ethylmaleimid, eine Sulfhydryl-Reagenz, waren von der Fa. Sigma (Taufkirchen).
- GppNHp, ein gegen enzymatische Hydrolyse stabiles GTP-Analogon, und
- TRIS waren von Boeringer (Mannheim).

Alle weiteren Chemikalien wurden von Fa. Merck (Darmstadt), jeweils im höchsten Reinheitsgrad, erhalten.

- Szintillationsflüssigkeit: HP/b war von der Fa. Beckman (München)

Von Pirenzepin, NMS, Atropin und Carbachol wurden Vorratslösungen der Konzentration 10^{-1} oder 10^{-3} in Aqua bidest hergestellt und in Plastikgefäßen in Portionen zu je 500 μl bei -20°C aufbewahrt.

Lösungen von AF-DX 116 und Hexahydro-Sila-Diphenidol wurden jeweils in DMSO zu einer Konzentration von 10^{-1} M

frisch hergestellt und mit Aqua bidest auf eine Konzentration von 10^{-3} M verdünnt.

Alle Verdünnungsreihen erfolgten in TRIS/HCL Puffer (50 mM, pH 7,5)

2.4 Geräte

Filtrationsgeräte: Hierbei wurden Geräte, die nach dem Prinzip der "Millipore" Filtrationstöpfе gebaut sind, verwendet, mit denen eine gleichzeitige Filtration von 45 Proben pro Gerät möglich ist.

Zentrifuge: RC-5B Refrigerated Centrifuge (SORVALL-Instruments)

β -Zähler (Liquid Scintillation Systems: Beckman LS 2800)

Mikroskop-Densitometer: Leitz T.A.S.

3. Ergebnisse

3.1 Bindungsverhalten der Muskarinrezeptoren im Schweinemagen

3.1.1 Assoziationsbindungskurve

Abbildung 1 und 2 zeigen die Bindung des [^3H]NMS an den Muskarinrezeptoren der Mukosa (1) und der Muskularis (2) in Abhängigkeit der Zeit. Die Bindungskurven verlaufen asymptotisch. Wie aus beiden Abbildungen ersichtlich ist, bindet der Radioligand in den ersten Minuten mit einer hohen Geschwindigkeit die Rezeptoren, so daß die Kurve anfänglich beinahe geradlinig zu sein scheint. Mit der Zeit aber nimmt die Bindung lediglich langsam zu, bis die Kurve fast parallel zu der Abszisse läuft, was den Gleichgewichtszustand der Ligand-Rezeptor-Bindung demonstriert. Dies ist typisch für Reaktionen, die nach einer Kinetik 1. bzw. 2. Ordnung ablaufen. Hierbei handelt es sich um eine bimolekulare Reaktion. Da aber der Radioligand, [^3H]NMS, in so einem hohen Überschuß vorlag, daß nicht mehr als 6% seiner anfänglichen freien Konzentration beim Equilibrium gebunden wurde, konnte die [^3H]NMS-Konzentration während der Assoziationsdauer annähernd als konstant betrachtet und der freien Konzentration in der Zeit $t=0$ gleichgesetzt werden.

Im Gegensatz zu der spezifischen nimmt die unspezifische Bindung, die in Gegenwart von $1\text{ }\mu\text{M}$ Atropin bestimmt wurde, in Abhängigkeit der Zeit nicht zu.

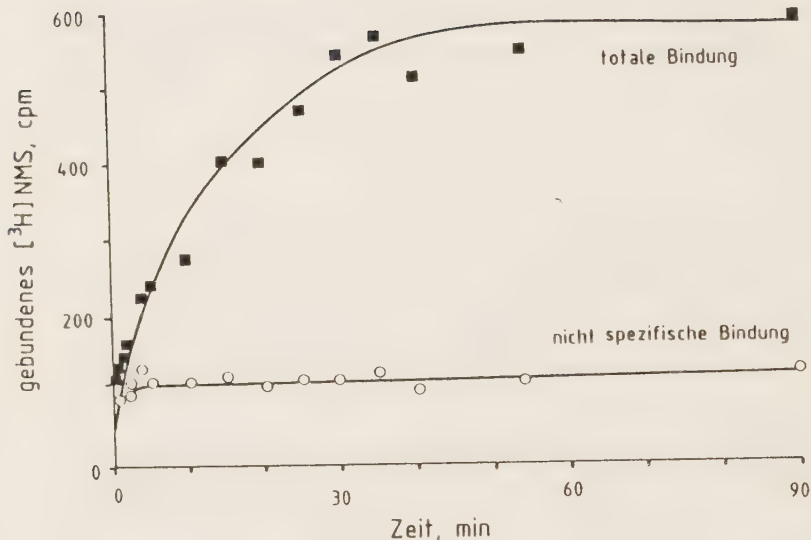


Abb. 13

Zeitabhängige Assoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung an Mukosa-homogenat des Schweinemagens. Die Kurve demonstriert ein repräsentatives Experiment, das in dreifachem Ansatz und bei 25°C Raumtemperatur durchgeführt wurde. Das Experiment wurde einmal mit gleichem Ergebnis wiederholt. Die Konzentration des Radioliganden betrug $0,25 \text{ nM}$. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ Atropin bestimmt. Die spezifische Bindung (total - unspezifisch) nimmt als Funktion der Zeit zu bis der Reaktionsgleichgewichtszustand erreicht wird. Im Gegensatz dazu nimmt die unspezifische Bindung (O) nicht zu.

Für alle durchgeführten Bindungsexperimente wurde eine Inkubationszeit von 35 Minuten gewählt, bei der, wie aus beiden Assoziationskurven ersichtlich ist, ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation der Ligand-Rezeptor-Bindung erreicht worden ist.

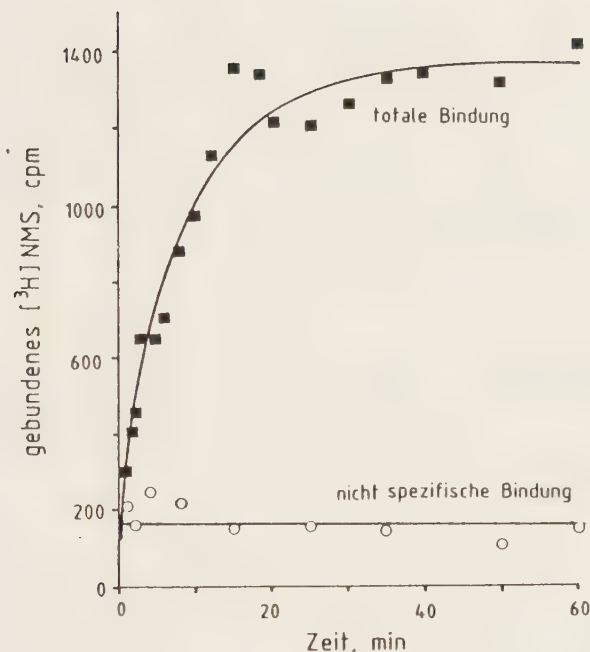


Abb. 2
Zeitabhängige Assoziation von [3 H]NMS-Bindung an Muskularishomogenat des Schweinemagens. Die unspezifische Bindung (O) wurde durch Zusatz von $1\mu\text{M}$ Atropin ermittelt. Das Experiment wurde mit gleichem Ergebnis einmal wiederholt. Die danach gewählte Inkubationsdauer für Verdrängungsversuche betrug 35 Minuten.

3.1.2 Bindungsverhalten von N-Methylscopolamin

Als ein nicht selektiver Antagonist unterscheidet NMS nicht unter den verschiedenen Muskarinrezeptoren. Das Bindungsverhalten von NMS wurde direkt und indirekt untersucht. Um die Sättigbarkeit der Muskarinrezeptoren

in der Mukosa bzw. Muskularis zu demonstrieren, wurden konstanten Mengen an Membranpräparationen steigende Konzentrationen von [^3H]NMS zugesetzt. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-6} M Atropin bestimmt. Wie aus den Abbildungen 3 und 4 ersichtlich ist, nimmt die unspezifische Bindung mit steigender [^3H]NMS-Konzentration zu. Im Gegensatz dazu erreicht die spezifische Bindung ein Plateau, was auf die Sättigung der Rezeptorbindungsstellen und folglich auf ihre Spezifität hindeutet.

Die Auftragung der Daten nach der Methode von Scatchard (kleine Abb.) ergab in beiden Regionen eine lineare Regressionsgerade, die für die Homogenität der Rezeptoren sowohl in der Mukosa als auch in der Muskularis spricht.

Weiter wurde indirekt das Bindungsverhalten von NMS untersucht, indem die Bindung von 0,25 nM [^3H]NMS in Gegenwart steigender Konzentrationen von nicht markiertem Liganden, NMS, ermittelt wurde. Die Analyse der resultierenden Verdrängungskurven anhand des Computerprogramms "LIGAND" ergab in beiden Regionen (Mukosa und Muskularis) eine homogene Bindungsstelle für NMS (Abb.3 & 4). Die Kurven sind steil und gehorchen dem Massen-Wirkungs-Gesetz.

NMS bindet mit einer hohen Affinität die Rezeptoren sowohl in der Mukosa als auch in der Muskularis. Für die Mukosa ergab sich ein K_d -Wert ($\pm$ S.E.M.) von $0,31 \pm 0,03$ nM mit einer Bindungskapazität ($\pm$ S.E.M.) von $10,5 \pm 1,3$ fmol/mg Protein ($n=14$) und für die Muskularis ein K_d -Wert von $0,26 \pm 0,01$ nM mit einer Bindungskapazität von $90 \pm 3,8$ fmol/mg ($n=15$).

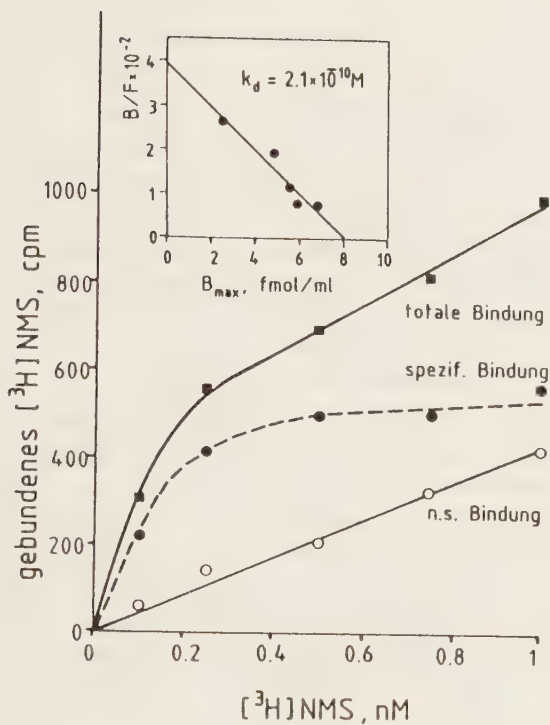


Abb. 3

Sättigung der Muskarinrezeptoren im Homogenat der Fundusmukosa des Schweinemagens durch $[^3\text{H}]\text{NMS}$. Bei 25°C wurde die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung mit 5 verschiedenen Radioligandenkonzentrationen (0,1 - 1 nM) bestimmt. Die unspezifische Bindung (o) wurde in Gegenwart von 1 μM Atropin ermittelt. Die Inkubationsdauer betrug 35 Minuten. Die kleine Abb. zeigt die Auftragung der Daten nach Scatchard (Scatchard Plot), wo auf der Abszisse der gebundene Radioligand B und auf der Ordinate der Quotient aus der Menge des gebundenen und freien Radioliganden B/F aufgetragen ist. Hierbei entspricht die Steigung der Gerade der Affinität des Liganden zu den Rezeptoren ($K_d = 0,21 \text{ nM}$), der Schnittpunkt der Gerade mit der X-Achse entspricht der Menge der vorhandenen Rezeptoren pro ml Reaktionsgemisch. Die Bindungskurve demonstriert ein repräsentatives Experiment, das in dreifacher Bestimmung durchgeführt wurde.

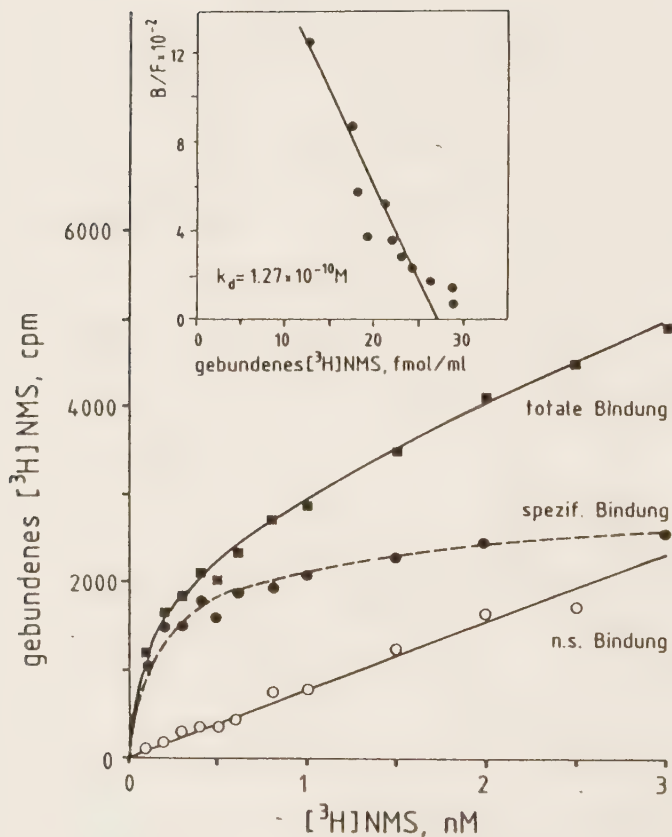


Abb. 4

Sättigung der Muskarinrezeptoren im Homogenat der Fundusmuskularis des Schweinemagens durch [^3H]NMS. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment, in dem die Bindung des Radioliganden mit 12 verschiedenen Konzentrationen (0,05 - 3 nM) bei 25°C bestimmt wurde. Die unspezifische Bindung (o) wurde durch Zusatz von 1 μM Atropin ermittelt. Die Inkubation wurde nach 35 Minuten durch die Filtrationstechnik beendet. Der "Scatchard Plot" (die kleine Abb.) ergab einen K_d von 0,13 nM.

3.1.3 Bindungsverhalten von Pirenzepin

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens des M_1 -selektiven Antagonisten, Pirenzepin, erfolgte indirekt anhand der Verdrängungsexperimente, indem die Bindung des [3H]NMS durch Pirenzepin in steigender Konzentration verdrängt wurde. Anhand des Computerprogramms "LIGAND" wurde das Bindungsverhalten des Pirenzepins zu den Muskarinrezeptoren in der Mukosa und Muskularis in Bezug auf eventuelle Heterogenität der Bindungsstellen untersucht. Hierbei wurden die Bindungskurven jeweils unter der Annahme:

- a) einer homogenen Bindungsstelle für Pirenzepin
- b) zweier bzw. dreier verschiedener Bindungsstellen (zwei oder drei Rezeptorsubklassen) für Pirenzepin

analysiert. Die zwei Modelle wurden miteinander verglichen, und die Signifikanz für das eine oder das andere Modell wurde ermittelt (Abschnitt "Theorie").

In den durchgeführten Verdrängungsexperimenten wurde die beste Kurvenanpassung durch ein Modell, das eine einzige Bindungsstelle für Pirenzepin annimmt, erzielt. Modelle mit 2 oder 3 Bindungsstellen erlaubten keine Verbesserung der Kurvenanpassung.

Wie aus der Abb.5 und Tabelle 1 ersichtlich ist, weisen die K_d -Schätzwerte sowohl in der Mukosa als auch in der Muskularis auf eine homogene Rezeptorpopulation hin, die der M_2 -Subklasse zuzuschreiben ist. Dem entspricht die Steilheit der Verdrängungskurven.

3.1.4 Bindungsverhalten von Hexahydro-Sila-Diphenidol

Wie aus elektrophysiologischen Experimenten bekannt ist, zeigt HHSD eine höhere Affinität für die Muskarinrezeptoren des Intestinaltraktes als der Herzmuskulatur (Mutschler und Lambrecht, 1984).

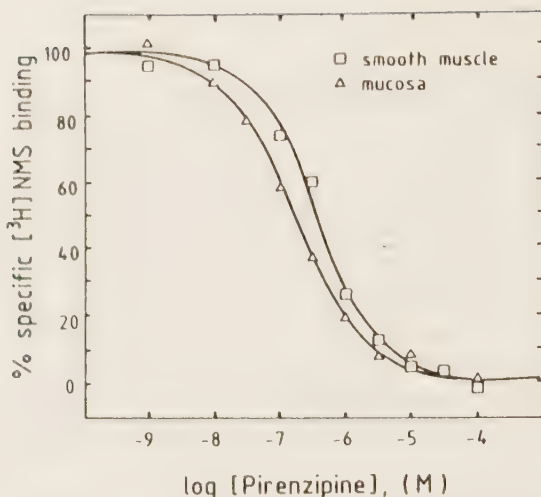


Abb. 5

Verdrängung der $[^3\text{H}]$ N-methylscopolaminbindung an Muskarinrezeptoren der Mukosa (Δ) und der Muskularis ($\square$) des Schweinemagens durch den M_1 -selektiven Antagonisten Pirenzepin. Jede Bindungskurve stellt den Mittelwert ($\pm$ S.E.M.) aus vier unabhängigen Versuchen dar, die in dreifacher Bestimmung ausgeführt wurden. Der K_d -Wert für Pirenzepin in der Mukosa beträgt 124 ± 16 nM, der in der Muskularis 229 ± 36 nM, was für die Anwesenheit der M_2 -Rezeptoren in beiden Regionen spricht.

Um die Bindungseigenschaften zu den Rezeptoren der Mukosa und der benachbarten Muskularis des Magens im Radiorezeptorassay zu untersuchen, wurden indirekte Bindungsexperimente durchgeführt, wobei die Bindung von $[^3\text{H}]$ NMS durch HHSD in steigender Konzentration verdrängt wurde.

Hierbei zeigte HHSD eine höhere Affinität für die Mukosa als für die Muskularis (Abb.6).

Die Bindungskurven in Mukosahomogenat sind besser mit einem "2-sites"-Modell zu beschreiben, das die Existenz zweier verschiedenen Bindungsstellen annimmt. HHSD erkennt in der Mukosa eine hochaffine Bindungsstelle mit

einem $K_d = 3$ nM, was 75% der gesamten Bindungsstellen ausmacht und eine niederaffine Bindungsstelle mit einem $K_d = 297$ nM.

Im Gegensatz dazu erkennt HHSD im Muskularishomogenat lediglich eine homogene Bindungsstelle mit einem K_d von 88 nM.

Wie aus der Abb.6 und Tabelle 1 ersichtlich ist, zeigt HHSD eine mehrfach höhere Affinität zu den Mukosa- als zu den Muskularis-Rezeptoren.

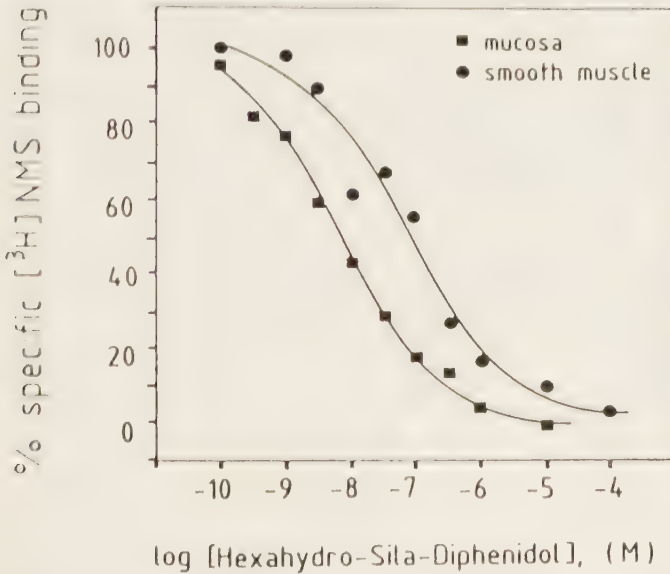


Abb. 6

Die [3 H]N-Methylscopolaminbindung an die Muskarinrezeptoren der Mukosa (■) und Muskularis (●) wurde mit steigenden Konzentrationen des nicht markierten M_2 -selektiven Antagonisten Hexahydro-Sila-Diphenidol verdrängt. Die mit dem Mukosahomogenat ermittelten Kurven waren signifikant besser unter Annahme zweier verschiedener Bindungsstellen zu beschreiben, wobei 75% der gesamten Rezeptoren hochaffin waren ($K_d = 3 \pm 0,6$ nM für die hochaffine und $K_d = 297 \pm 103$ nM für die niederaffine Bindungsstelle) ($P < 0,001$, $n=4$). In der Muskularis (●) erkennt HHSD lediglich eine homogene Bindungsstelle ($K_d = 88 \pm 19$ nM, $n=3$). Die Bindungskurven sind Mittelwerte aus jeweils 4 (■) und 3 (●) unabhängigen Experimenten in dreifacher Bestimmung.

3.1.5 Bindungsverhalten von AF-DX 116

AF-DX 116 zeigt eine Selektivität für verschiedene Typen von M_2 -Rezeptoren in verschiedenen Geweben. Die höchste Affinität wurde für M_2 -Rezeptoren des Herzmuskels beschrieben (Hammer et al., 1986; Giachetti et al., 1986).

In den durchgeführten indirekten Bindungsexperimenten wurde festgestellt, daß dieser kardioselektive Antagonist im Gegensatz zu HHSD eine niedrigere Affinität zu den Mukosa- als zu den Muskularis-Rezeptoren hat (Abb.7). Hierbei ergaben sich K_d -Werte von 3385 nM für die Mukosa und von 462 nM für die Muskularis.

In beiden Geweben waren die Verdrängungskurven steil und anhand des "1-site" Modells am besten zu beschreiben.

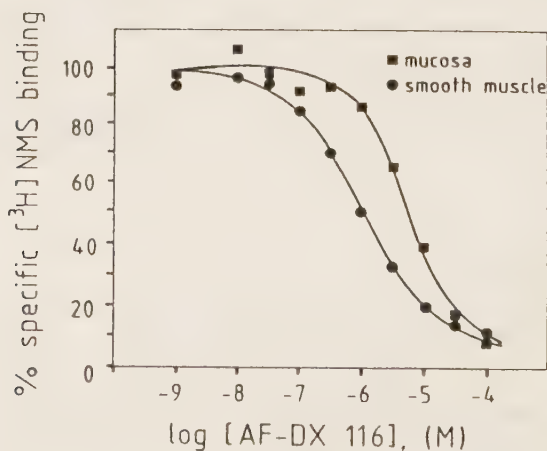


Abb. 7

Verdrängung der [^3H]N-Methylscopolaminbindung durch den kardioselektiven Antagonisten AF-DX 116. Die Kurven sind Mittelwerte aus vier (■) und drei (●) unabhängigen und in dreifacher Bestimmung ausgeführten Experimenten. AF-DX 116 zeigt eine 7 - fach höhere Affinität für die Rezeptoren der Muskularis ($K_d = 462 \pm 212$ nM) als für die Rezeptoren der Mukosa ($K_d = 3385 \pm 645$ nM). In beiden Regionen erkennt AF-DX 116 lediglich homogene Bindungsstellen.

Tabelle I

Bindungsaffinität verschiedener muskarinischer Liganden zu den Muskularis- und Mukosarezeptoren des Schweinemagens. Die Werte $\pm$ S.E.M. nM sind aus jeweils N unabhängig durchgeführten Experimenten. Die mit * gekennzeichneten Werte sind in μ M angegeben.

a) = K_d für die hochaffine Bindungsstelle

b) = K_d für die niederaffine Bindungsstelle

(%) = prozentualer Anteil der hochaffinen Bindungsstellen an den maximal vorhandenen Bindungsstellen (B_{max})

Ligand	Mukosa	N	Muskularis	N
NMS	0,31 $\pm$ 0,03	14	0,26 $\pm$ 0,01	15
Pirenzepin	124 $\pm$ 16	4	229 $\pm$ 36	4
HHSD	a) 3 $\pm$ 0.6 (75%) b) 297 $\pm$ 103	4	88 $\pm$ 19	3
AF-DX 116	3385 $\pm$ 645	3	462 $\pm$ 212	2
Carbachol	21,5 $\pm$ 2	7	a) 193 $\pm$ 36 (60%) b) 18 $\pm$ 2,5	6

3.1.6 Bindungsverhalten von Carbachol

In der Mukosa interagiert Carbachol mit einer homogenen Population von Bindungsstellen mit einem K_d -Wert von 21,5 μ M (n=7)(Abb.8a). Im Gegensatz dazu verlief die Verdrängungskurve in der Muskularis flacher und konnte anhand eines "2-sites" Modells signifikant besser beschrieben werden. Die errechneten K_d -Werte waren 193 nM (60% der B_{max}) für die hochaffine Agonistenbindungsstelle und 18 μ M (entspricht 40% der B_{max}) für die niederaffine Agonistenbindungsstelle (Abb.8b)(Tabelle 1).

3.1.7 Einfluß von GppNHp auf die Bindungseigenschaft des Carbachols

Aus Bindungsstudien ist bekannt, daß Guaninnukleotide (GTP) die Agonistenbindung an M_2 -Rezeptoren des Herzmuskels verändern (Mattera et al., 1985). Die Agonistenbindung zu M_1 -Rezeptoren im Hirngewebe wird dagegen entweder nicht oder nur gering durch GTP beeinflusst (Berrie et al., 1979; Watson et al., 1986). Um den Einfluß dieser Bindungsmodulatoren auf die Bindung des Carbachols an die Mukosa- bzw. Muskularis-Rezeptoren zu untersuchen, wurde beim Radiorezeptorassay, jeweils parallel zum Kontrollexperiment, 0,1 mM GppNHp (ein stabiles GTP-Analogon) zum Inkubationsmedium hinzugefügt.

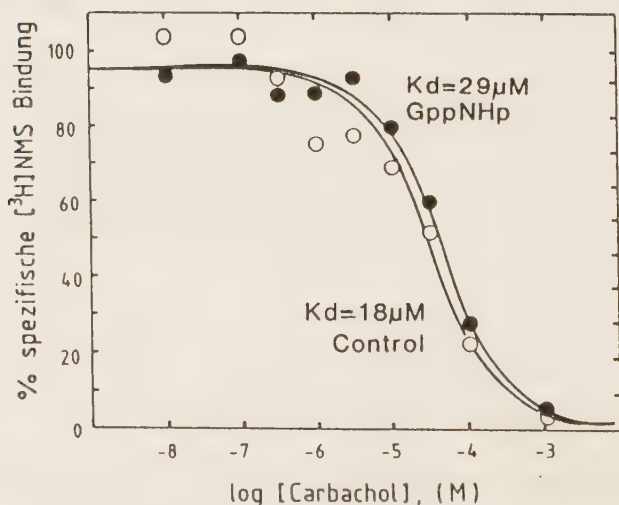


Abb. 8a

Einfluß von GppNHp auf die Agonistenbindung in der Mukosa. Carbachol bindet mit einer niedrigen Affinität an Rezeptoren der Mukosa, an eine homogene Bindungsstelle ($K_d = 18 \pm 4 \mu\text{M}$). In Gegenwart von GppNHp (0,1 mM) verändert sich die Bindungsaffinität des Carbachols nicht signifikant ($K_d = 30 \pm 7 \mu\text{M}$). Die Kurven stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dar, die in dreifacher Bestimmung durchgeführt wurden.

GppNHp reduzierte die Bindungsaffinität des Carbachols in der Mukosa nur wenig, wobei der K_d -Wert von 18 μM auf 30 μM anstieg (Abb. 8a). Eine Analyse mit dem Computerprogramm "ALLFIT" ergab, daß der parallele Shift zwischen der Kontroll- und der GTP-Kurve nicht signifikant war.

Im Gegensatz dazu wurde durch Zusatz von 0,1 mM GppNHp die Bindung von Carbachol zu den M_2 -Rezeptoren der Muskularis um das 30-fache der Ausgangsbindung erniedrigt. Die Bindungskurve, die in Abwesenheit von GppNHp zwei verschiedene Bindungsstellen, eine hochaffine (H) mit einem K_d -Wert von 164 nM und eine niederaffine (L) mit einem K_d -Wert von 18 μM zeigte (Abb. 8b), wurde in Gegenwart von 0,1 mM GppNHp so nach rechts verschoben, daß die Kurve insgesamt steiler und niederaffiner wurde.

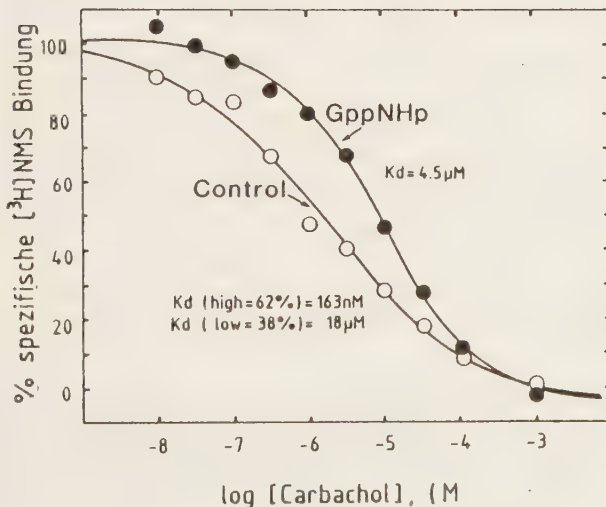


Abb. 8b

Einfluß von GppNHp auf die Agonistenbindung in der Muskularis. Carbachol erkennt eine hochaffine ($K_d = 164 \pm 47$ nM) und eine niederaffine Bindungsstelle ($K_d = 18 \pm 4$ μM) ($p < 0,001$). Der Zusatz von GppNHp (0,1 mM) zum Inkubationsmedium vermindert die Affinität des Carbachols signifikant ($K_d = 4,6 \pm 0,4$ μM). Die Bindungskurven sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten in dreifacher Bestimmung.

Der errechnete K_d -Wert betrug $4,6 \mu\text{M}$ und war am besten durch ein "1-site"-Modell zu beschreiben (Siehe Tabelle II).

Tabelle II

Bindungsaffinität von Carbachol zu den Muskarinrezeptoren der Mukosa und Muskularis des Schweinemagens in Abwesenheit und Gegenwart von $0,1 \text{ mM}$ GppNHp bzw. 1 mM NEM. Die Werte $\pm$ S.E.M. sind Mittelwerte aus N unabhängig durchgeführten Experimenten, die in μM angegeben sind.

a) = K_d für den hochaffinen und

b) = K_d für den niederaffinen Agonistenbindungszustand

Agonist $\pm$ Modulator	Mukosa K_d (μM)	N	Muskularis K_d (μM)	N
Carbachol	18 ± 4	6	a) $0,164 \pm 0,47$ b) $18 \pm 0,4$	7
Carb & GppNHp	30 ± 7	3	$4,6 \pm 0,4$	3
Carbachol	26 ± 4	3	a) $0,259 \pm 0,11$ b) 19 ± 6	3
Carb & NEM	17 ± 2	3	a) $0,081 \pm 0,02$ b) 10 ± 4	3

3.1.8 Einfluß von NEM auf die Bindungseigenschaft des Carbachols

Im weiteren wurde der Einfluß von NEM (1 mM) auf die Bindungsaffinität der M_2 -Rezeptoren für Carbachol untersucht.

Sulphydryl-Reagenzien steigern die Bindungsaffinität der M_1 -Rezeptoren für die Agonisten. Im Gegensatz dazu nimmt die Bindungsaffinität der im Hirnstamm und Herz (M_2 -Gewebe) lokalisierten Rezeptoren für Agonisten nach einer NEM-Behandlung ab (Aronstam et al., 1978; Vickroy et al., 1983; Flynn et al., 1985).

In den durchgeführten Bindungsexperimenten beeinflusste NEM die Bindungsaffinität für Carbachol deutlich stärker in der Muskularis als in der Mukosa.

In der Mukosa (Abb. 9a) ist ohne ($K_d = 26 \mu\text{M}$) und mit NEM-Behandlung (1 mM) ($K_d = 17 \mu\text{M}$) eine steile Kurve vom niederaffinen Bindungstyp zu beobachten. Die Linksverlagerung der Bindungskurve ergab nach der Computeranalyse mit "ALLFIT" keinen signifikanten Shift.

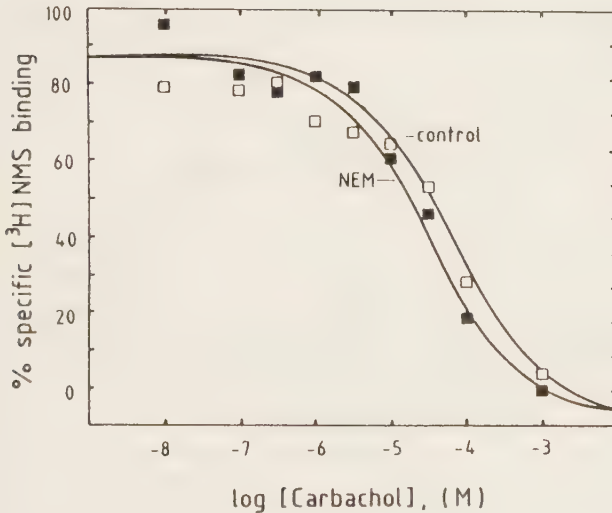


Abb. 9a

Einfluß von NEM auf die Agonistenbindung in der Mukosa. Die Bindungsaffinität des Carbachols ($K_d = 26 \pm 4 \mu\text{M}$) wurde durch die Vorbehandlung des Mukosapräparates mit NEM nicht signifikant verändert ($K_d = 17 \pm 2 \mu\text{M}$). Die Daten stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dar.

In der Muskularis jedoch bewirkte dieselbe Vorbehandlung des Gewebepreparates mit 1mM NEM eine Zunahme der Bindungsaffinität von Carbachol zu den M_2 -Rezeptoren um etwa das 3-fache der Ausgangsbindung (Abb.9b). Die Bindungskurve hatte hier immer noch einen flachen Verlauf und war signifikant besser anhand des "2-sites" Modells zu beschreiben. Hierbei veränderte sich der K_d -Wert für hochaffine Bindungsstelle von 259 nM auf 81 nM, der für die niederaffine Bindungsstelle von 19 μ M auf 10 μ M. Der Anteil der hochaffinen Bindungsstellen erhöhte sich von 56% auf 76% (Siehe Tabelle II).

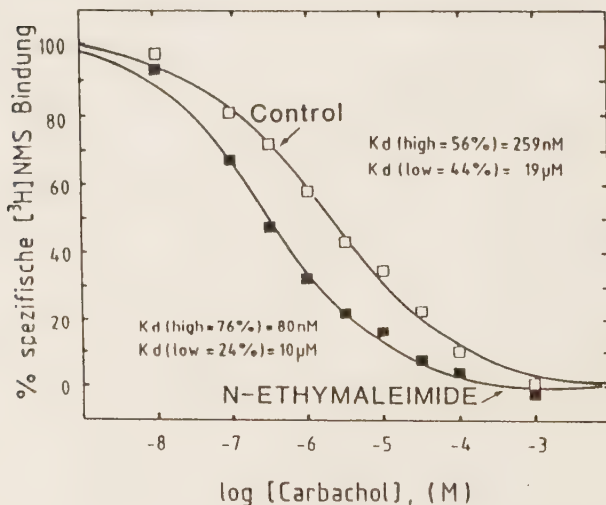


Abb. 9b

Einfluß von NEM auf die Agonistenbindung in der Muskularis. Vorbehandlung des Muskularishomogenates mit NEM erhöht die Bindungsaffinität des Carbachols um etwa das 3-fache der Ausgangsaffinität. Die Verdrängungskurve wird nach rechts verlagert. Der K_d -Wert für die hochaffine Bindungsstelle (259 ± 115 nM) wurde auf 81 ± 22 nM erhöht. Der K_d -Wert für die niederaffine Bindungsstelle veränderte sich von 19 ± 6 μ M auf 10 ± 4 μ M. Auch nach Behandlung mit NEM war die Verdrängungskurve am besten durch ein "2-sites" Modell repräsentiert ($P < 0,01$), wobei sich allerdings der Anteil der hochaffinen Bindungsstellen von 56% auf 76% der Gesamtkapazität erhöhte. Die Kurven sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2 Typisierung der Muskarinrezeptoren im menschlichen Magen

3.2.1 Assoziationsbindungskurve

Die mit dem menschlichen Gewebehomogenat durchgeführten Assoziationsbindungsstudien ergaben ähnliche Daten wie mit dem Schweinegewebshomogenat (Siehe 3.1.1). Hierbei wurde eine Inkubationszeit von 35 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) gewählt, bei der ein Reaktionsgleichgewichtszustand erreicht war.

3.2.2 Bindungsverhalten von N-Methylscopolamin

Die hierbei durchgeführten direkten Bindungsstudien mit [³H]NMS ergaben ähnliche Resultate wie die Experimente mit dem Schweinematerial (vergl. 3.1.2). Die für [³H]NMS errechnete maximale Bindungskapazität in der Mukosa von $27,5 \pm 4,4$ fmol/mg Protein unterschied sich von der in der Muskularis berechneten ($B_{\max} = 149 \pm 31$ fmol/mg Protein) um den Faktor 5.

Die Verdrängungskurven von [³H]NMS durch NMS waren in beiden Regionen steil und am besten zu beschreiben unter Annahme einer homogenen Bindungsstelle (Abb. 10 & 11). Sie ergaben einen K_d -Wert von $0,38 \pm 0,08$ nM (n=11) für die Mukosa und einen K_d -Wert von $0,37 \pm 0,15$ nM (n=5) für die Muskularis.

3.2.3 Bindungsverhalten von Pirenzepin

Wie aus der Tabelle III zu entnehmen ist, wurde Pirenzepin in verschiedenen Mukosapräparationen mit unterschiedlicher Affinität gebunden. Die Variation der Affinität bewegte sich im Bereich von 20 bis 358 nM.

Tabelle III

Bindungsaffinität des M_1 -selektiven Antagonisten Pirenzepin bzw. NMS in menschlicher Magenmukosa. Die Werte $\pm$ S.E. sind jeweils von einem einzelnen Experiment und wurden anhand des Computerprogramms "LIGAND" ermittelt. Mit jedem Mukosahomogenat wurden parallele Bindungskurven mit Pirenzepin und NMS durchgeführt. Bei einigen Experimenten wurde der K_d -Wert für NMS auf 0,38 nM festgelegt, der den Mittelwert aus allen übrigen Experimenten darstellt. Mit diesem Wert wurde dann die Pirenzepinkurve analysiert. Alle K_d -Werte sind in nM ausgedrückt.

Gewebe	Krankheit	Pirenzepin	NMS	B_{max} fmol/mg Protein
Corpusmukosa von 68 j. Patient	Metas. Magen-Ca	132 $\pm$ 42	0,36 $\pm$ 0,15	46
Corpusmukosa von 52 j. Patient	Magen- stumpf- Ca	38 $\pm$ 26	0,14 $\pm$ 0,11	12
Corpusmukosa von 52 j. Patient	Magen- Ca	99 $\pm$ 32	0,19 $\pm$ 0,08	28
Corpusmukosa von 62 j. Patientin	Magen- Ca	42 $\pm$ 24	0,1 $\pm$ 0,07	34
Corpusmukosa von 39 j. Patientin	Magen- Ca	25 $\pm$ 19	0,98 $\pm$ 0,85	10
Corpusmukosa von 65 j. Patient	Magen- Ca	206 $\pm$ 49	-----	43
Corpusmukosa von 64 j. Patientin	Magen- Ca	254 $\pm$ 91	-----	36
Corpusmukosa von 79 j. Patientin	Magen- Ca	142 $\pm$ 98	0,26 $\pm$ 0,22	17
Corpusmukosa von 33 j. Patient	Magen- Ca	-----	0,45 $\pm$ 0,18	39

Corpusmukosa von 39 j. Patient	Hyper- gastrin- ämie	20±23	0,19±0,16	8
Corpusmukosa von 41 j. Patient	Ulcus ventriculi	358±197	0,72±0,54	68
Antrum mukosa von 46 j. Patientin	rezid. Ulzera im Pylorus & Bulbus duodeni	345±179	-----	17,5
Corpusmukosa von 36 j. Patient	Ulcus im Bulbus duodeni	21±14	0,48±0,33	31
Corpusmukosa von 66 j. Patientin	Z. n. B II	248±148	0,37±0,29	12

Der Mittelwert für die Affinität des Pirenzepins in der Mukosa war 149 ± 31 nM. Abbildung 10 zeigt ein repräsentatives Experiment für die Verdrängungskurve des [3 H]NMS durch Pirenzepin.

Die Verdrängungskurven mit Muskularishomogenat lagen rechts von denen mit Mukosahomogenat beobachteten. Sie waren steile Kurven, die mit dem "LIGAND" als homogene Bindungsstellen beschrieben werden konnten (Abb. 11). Es ergab sich ein K_d -Wert von 518 ± 106 nM (Mittelwert $\pm$ S.E.M.; $n=2$).

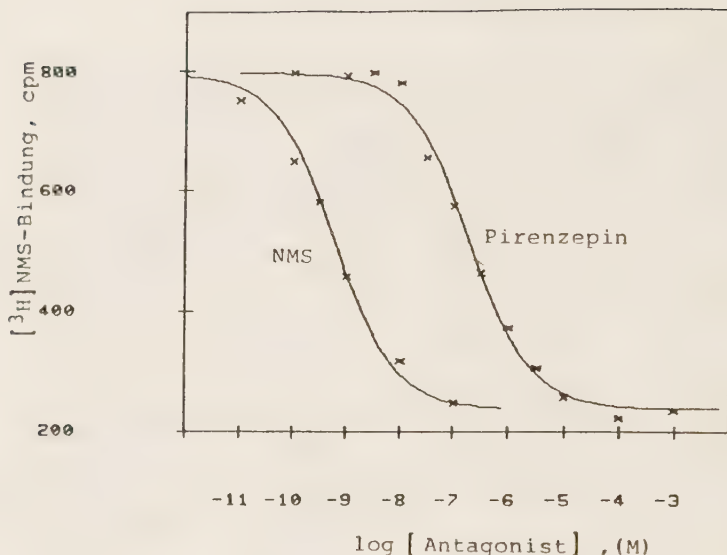


Abb. 10

Verdrängungskurve von [^3H]NMS von den Muskarinrezeptoren durch NMS und Pirenzepin in menschlicher Magenmukosa. Pirenzepin erkennt hier eine homogene M_2 -Bindungsstelle mit einer Affinität von ($K_d \pm \text{S.E.}$) $132 \pm 42 \text{ nM}$. Die Affinität von NMS beträgt $0,36 \pm 0,15 \text{ nM}$. Die Kurven, die in zwei- bzw. dreifacher Bestimmung durchgeführt wurden, sind repräsentativ und wurden mehrmals mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt (Tab.III). Die Magenmukosa entstammte einem 68-jährigen männlichen Patienten, der wegen Magenkarzinom operiert wurde.

3.2.4 Bindungsverhalten von Carbachol

Carbachol band in der Mukosa eine Bindungsstelle vom niederaffinen Typ mit einem K_d -Wert von $37 \pm 15 \text{ } \mu\text{M}$ (Mittelwert $\pm \text{S.E.M.}$)(Abb. 12a; Tab. IV).

Die mit Muskularis durchgeführten Experimente ergaben Verdrängungskurven, die besser anhand des "2-sites" Modells zu beschreiben waren.

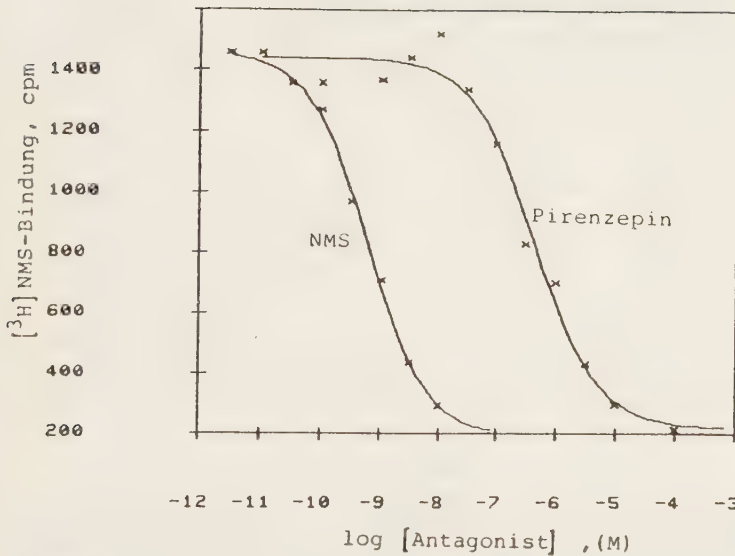


Abb. 11

Verdrängung der [³H]NMS-Bindung von Muskarinrezeptoren der menschlichen Magenmuskularis durch NMS und Pirenzepin. Pirenzepin bindet hier an eine homogene M₂-Bindungsstelle ($K_d = 349 \pm 63$ nM). Die Affinität von NMS beträgt $0,38 \pm 0,08$ nM. Die Kurven sind repräsentativ und wurden einmal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. Die Magenmuskularis entstammte einer 39-jährigen Patientin, die wegen Magenkarzinom operiert wurde.

Die errechneten K_d -Werte betrugen 95 ± 67 nM ($n=3$) für den hochaffinen Bindungszustand (50% der B_{max}) und $3,7 \pm 1,9$ μ M für den niederaffinen Bindungszustand ($n=3$; $P=0,009$).

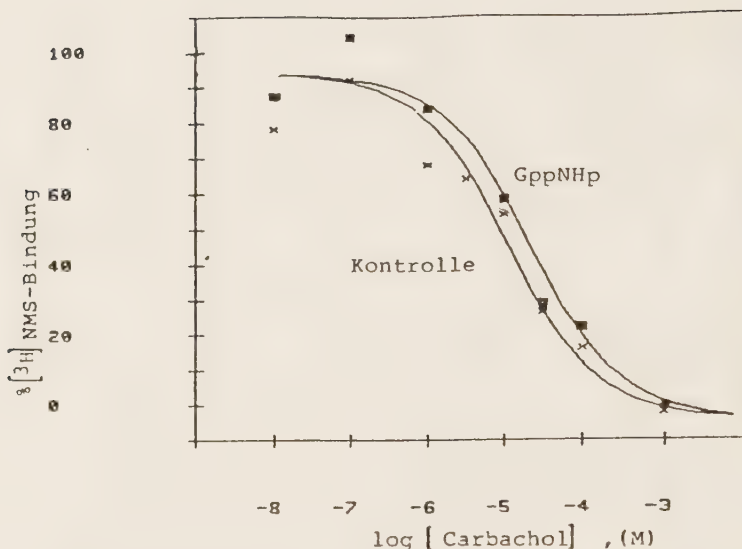


Abb. 12

Einfluß der GppNHp auf die Bindung des Carbachols an die Rezeptoren der menschlichen Mukosa. Carbachol band mit einer Affinität ($K_d \pm \text{S.E.}$) von $14 \pm 4 \mu\text{M}$ eine homogene niederaffine Bindungsstelle in der Mukosa. In Gegenwart von GppNHp ($0,1 \text{ mM}$) veränderte sich die Bindungsaffinität des Carbachols nicht signifikant ($K_d = 38 \pm 20 \mu\text{M}$). Die Kurven sind repräsentativ und wurden mehrmals mit ähnlichem Ergebnis wiederholt (Tab. IV). Die Magenmukosa entstammte einem 68-jährigen Patienten, der wegen Magenkarzinom operiert wurde.

3.2.5 Einfluß von GppNHp auf die Bindungsaffinität von Carbachol

GppNHp ($100 \mu\text{M}$) reduzierte signifikant die Bindungsaffinität des Carbachols in der Muskularis (Abb.13). Die Verdrängungskurve bewahrte aber im Gegensatz zu der von Experimenten mit dem Schweinematerial ihre flache Form und war signifikant besser anhand des "2-sites" Modells zu beschreiben. Die resultierenden K_d -Werte sind $480 \pm 216 \text{ nM}$ und $26 \pm 18 \mu\text{M}$ ($n=3$; $P=0,012$).

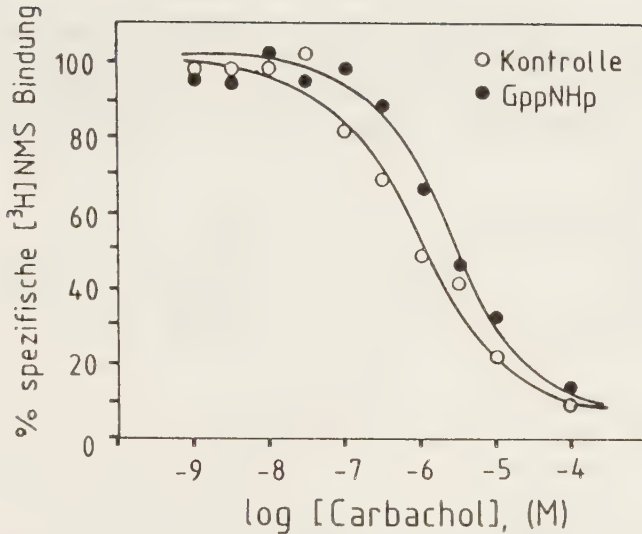


Abb. 13

Einfluß der GppNHp auf die Bindung des Carbachols an die M_2 -Rezeptoren der menschlichen Magenmuskularis. Carbachol erkannte hier einen hochaffinen ($K_d = 95 \pm 67$ nM; 50% der B_{max}) und einen niederaffinen Bindungszustand ($K_d = 4 \pm 2$ μ M) ($P=0,009$). Zugabe von 0,1 mM GppNHp zum Reaktionsgemisch shiftete die Bindungskurve nach rechts, wobei immer noch zwei Bindungsaffinitätszustände für Carbachol zu erkennen waren (hochaffine $K_d = 480 \pm 216$ nM, niederaffine $K_d = 26 \pm 18$ μ M) ($P=0,012$). Diese Kurven stellen die Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

Die K_d -Werte der Kontrollkurven sind im Abschnitt 3.2.4 zu ersehen.

Dagegen war der Effekt von GppNHp auf die Bindungsaffinität des Carbachols an Mukosarezeptoren minimal (Abb. 12). Analyse der Bindungskurven anhand des "LIGAND" ergab in beiden Fällen (ohne bzw. mit dem Zusatz von GppNHp) eine homogene Bindungsstelle vom niederaffinen Typ. Analyse der Kurven anhand von "ALLFIT" ergab keinen signifikanten Shift.

Tabelle IV

Bindungsaffinität des Carbachols für die Mukosarezeptoren des menschlichen Magens mit und ohne Zusatz von 0,1 mM GppNHp zum Reaktionsgemisch. Die Werte $\pm$ S.E. wurden mit Hilfe des Computerprogramms "LIGAND" ermittelt, wobei ein K_d -Wert für NMS von 0,38 nM angenommen wurde. Die K_d -Werte sind in μ M ausgedrückt.

Gewebe	Krankheit	Carb	Carb & GppNHp	B _{max} fmol/mg Prot.
81 j. Patient	Magen-Ca	106 $\pm$ 32	128 $\pm$ 66	12
60 j. Patient	Magen-Ca	8 $\pm$ 4	16 $\pm$ 11	---
68 j. Patient	Magen-Ca	14 $\pm$ 4	38 $\pm$ 20	18
60 j. Patientin	Magen-Ca	49 $\pm$ 37	66 $\pm$ 32	7
52 j. Patient	Magen-Ca	11,5 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1,3	34
42 j. Patientin	Magen- Ulkus	32 $\pm$ 11	36 $\pm$ 15	---

3.3 Radio-Rezeptor-Bindung im Mukosa-Gefrierschnitt

Um die Aussagekraft von Bindungsstudien unter Verwendung von Gewebeschnitten zu prüfen und die Kriterien geeigneter experimenteller Bedingungen zu bestimmen (Inkubationszeit, K_d -Werte, etc.), wurden parallele Experimente mit Homogenat und nativen Gewebeschnitten desselben Gewebes durchgeführt und miteinander verglichen.

In einem Sättigungsexperiment erreichte [^3H]NMS eine halbmaximale Besetzung der Rezeptoren bei einer Konzentration von 0,05 nM [^3H]NMS. Die graphische Darstellung dieser Bindung nach der Methode von Scatchard ergab eine lineare Regressionsgerade mit einem K_d -Wert von 0,14 nM (Abb. 14).

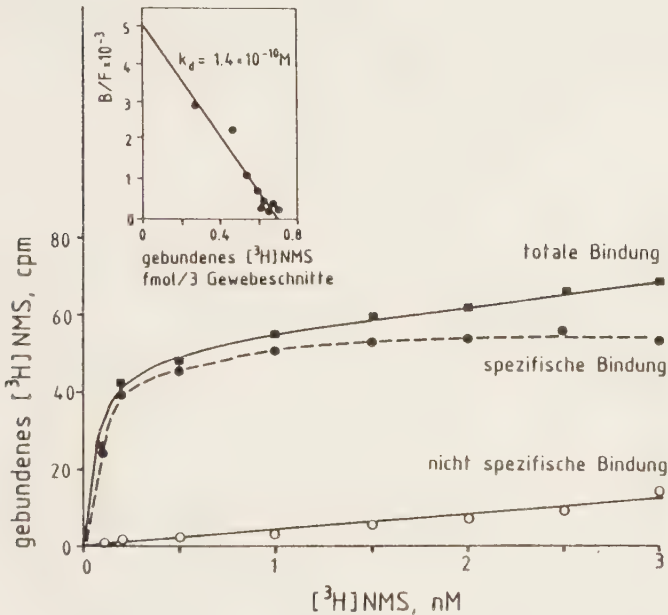


Abb. 14

Dargestellt ist die spezifische [^3H]NMS-Bindung an die Membranen der Mukosagefrierschnitte mit 8 verschiedenen Radioligandenkonzentrationen (0,05 - 3 nM). Die un-spezifische Bindung (O) wurde in Gegenwart von 10 μM Atropin bestimmt. Die Inkubationsdauer betrug 45 Minuten. Die Kurve stellt ein repräsentatives Experiment dar, das zweimal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt wurde. Das Mukosagewebe entstammte einem menschlichen Magen.

Im Vergleich zu dem Homogenat war keine längere Inkubationszeit notwendig, um das Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation zu erreichen. Entsprechend wurde eine Inkubationszeit von 45 Minuten gewählt (Abb. 15).

In den Abbildungen 16 a,b sind die Verdrängungskurven des [^3H]NMS durch NMS (a) und Pirenzepin (b) dargestellt. Sie sind Bindungskurven, die aus Experimenten mit dem Homogenat (O) bzw. mit Gefrierschnitt (■) erzielt wurden. Alle Bindungskurven waren von steiler Form und besser anhand des "1-site" Modells zu beschreiben.

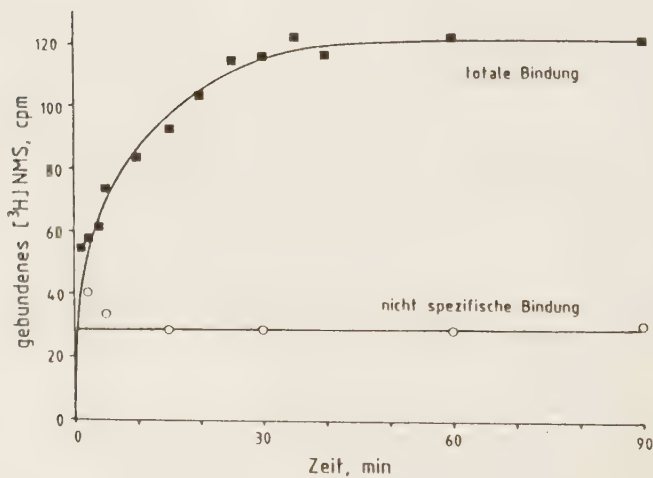


Abb. 15

Darstellung der Gleichgewichtseinstellung der Bindungsreaktion von [^3H]NMS (0,25 nM) mit Muskarinrezeptoren der Mukosagefrierschnitte. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 1 μM Atropin bestimmt.

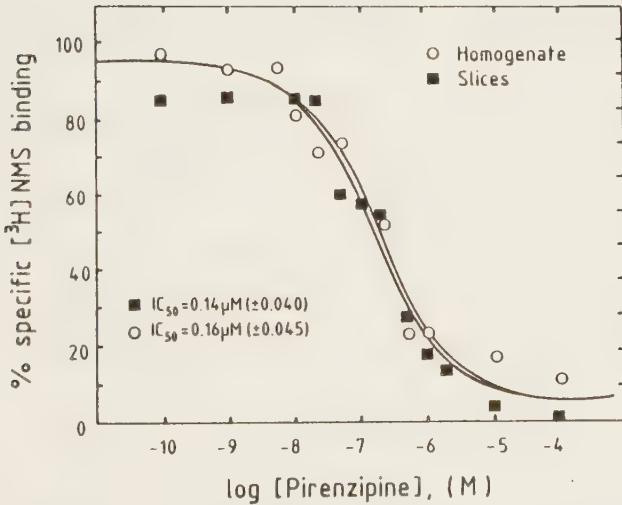
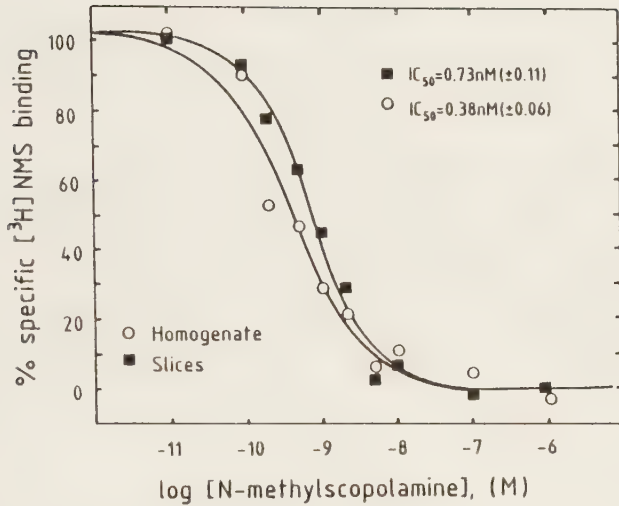


Abb. 16 a,b

Die Bindungskurven stellen die Resultate eines durch Computer unterstützten Kurvenanpassungsverfahrens dar und zeigen die gute Vergleichbarkeit von Verdrängungsexperimenten, die entweder in Gefrierschnitten oder in Homogenatsassays desselben Gewebes durchgeführt wurden.

3.4 Autoradiographische Untersuchung der Magenbiopsien

Bei autoradiographischer Darstellung der Rezeptorbindungsstellen wurde [^3H]NMS in zwei verschiedenen Konzentrationen 0,25 und 2,5 nM verwendet. Die unspezifische Bindung wurde durch den Zusatz von 10 μM Atropin ermittelt. Abbildung 17 zeigt die Bindung von [^3H]NMS in steigender Konzentration an Gefrierschnitte einer Biopsie.

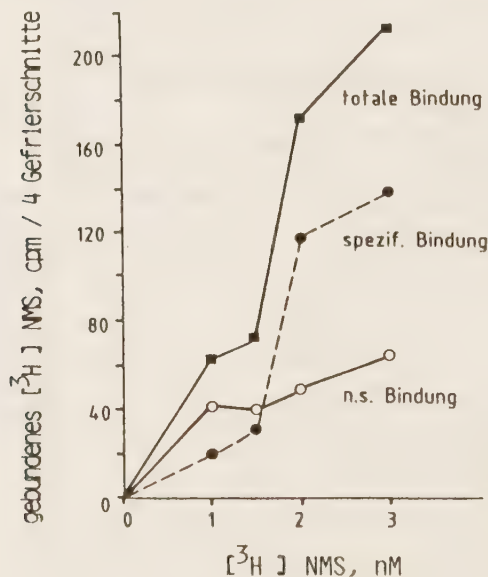


Abb. 17

Dargestellt ist die Bindung von [^3H]NMS in steigender Konzentration (1 - 3 nM) an 20 μM dicke Gefrierschnitte einer vom menschlichen Magen entnommenen Schleimhautbiopsie. Die Kurve ist repräsentativ für 3 weitere unabhängig durchgeführte Experimente. Die Bindung wurde durch direkte Szintillationsspektrophotometrie der Schnitte bestimmt.

Die gemessene optische Dichte sowie die Bindungsdichte (fmol/mg Gewebe) sind tabellarisch dargestellt (Tab. V). Hierbei wurde ein Tritium-Standard verwendet, der mit Hirngewebshomogenat hergestellt worden war (Kuhar and Unnerstall, 1985). Die Gewebeschnitte werden zusammen mit einem Tritium-Standard dem ^3H -Ultrofilm exponiert. Dieser Standard besteht aus gleich großen Gewebsportionen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tritium inkubiert wurden und somit zu unterschiedlichen Schwärzungen des Ultrofilmes führen. Abbildung 18 zeigt die Tritium-Standard-Kurve. Abbildung 19 repräsentiert die Autoradiogramme einer Biopsie (a - h).

Tabelle V

Optische Dichte und in fmol/mg Gewebe umgerechnete Bindungsdichte von 5 Biopsien menschlicher Magenschleimhaut. Die Gewebsschnitte wurden mit 2,5 nM [^3H]NMS inkubiert.

Biopsie	Optische Dichte	Bindungsdichte f mol/mg Protein
(1)	$0,28 \pm 0,03$	16,8
(2)	$0,28 \pm 0,03$	17,3
(3)	$0,26 \pm 0,01$	15,5
(4)	$0,26 \pm 0,009$	15,5
(5)	$0,27 \pm 0,01$	16,5

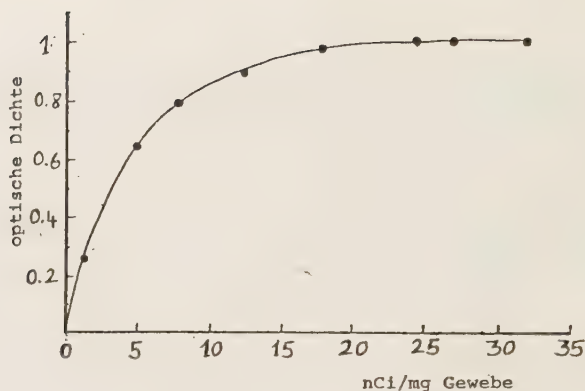


Abb. 18

Dargestellt ist die Beziehung der gemessenen optischen Dichte (Ordinate) zu der unterschiedlichen Tritiumkonzentration pro mg Rattenhirngewebes (Abszisse).

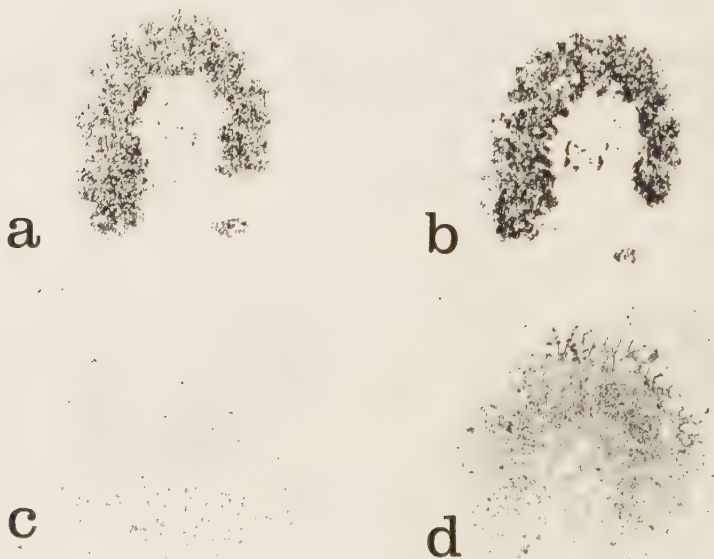
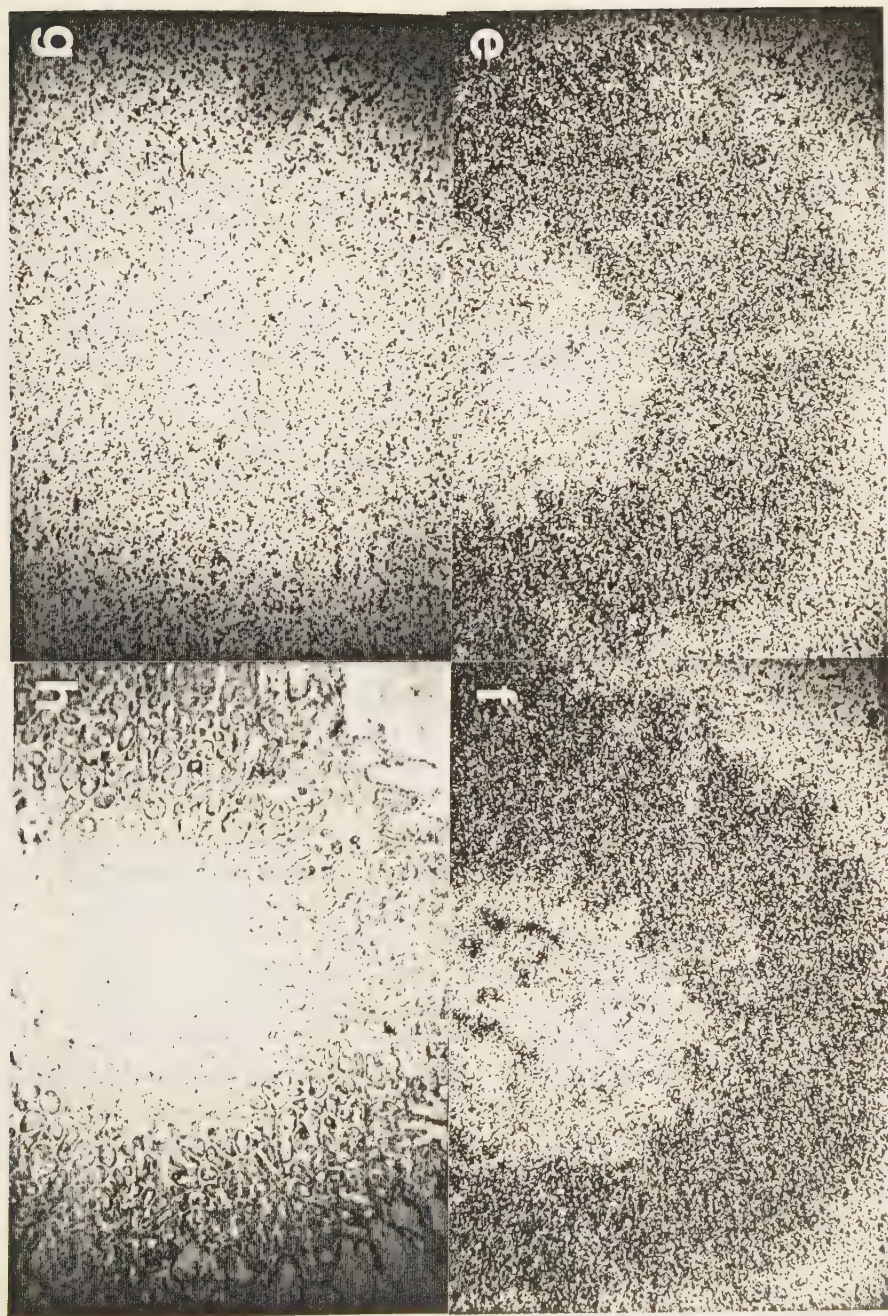


Abb. 19 a-h

a₃c zeigen die Autoradiogramme (a) 0,25 nM und (b) 2,5 nM [³H]NMS, (c) die unspezifische Bindung sowie (d) die histologische Färbung einer Biopsie bei einer 23-fachen Vergrößerung. e-h stellen dieselben Biopsieschnitte bei einer 80-fachen Vergrößerung.



4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Muskarinrezeptoren des Magens mit Hilfe der Radiorezeptorbindungstechnik charakterisiert. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

(1) Zur Subklassifizierung der M_2 -Rezeptoren in der Corposmukosa und benachbarten Muskularis wurde Schweinemagen verwendet.

(2) Es wurden vergleichende Bindungsstudien mit dem menschlichen Magengewebe durchgeführt.

(3) Es wurde untersucht, ob die Autoradiographie eine geeignete Methode zur Untersuchung der Muskarinrezeptoren von Schleimhautbiopsien des menschlichen Magens sei.

Als Unterscheidungskriterium verschiedener Rezeptoren galt die Affinität selektiver Antagonisten zu den Rezeptoren und die Modulierbarkeit des Agonistenbindungszustandes in beiden Regionen.

Als Radioligand fungierte tritiiertes N-Methylscopolamin ($[^3H]NMS$), ein klassischer muskarinischer Antagonist, der über eine hohe Bindungsaffinität verfügt und niedrige unspezifische Bindung vorweist.

Bindungskurven wurden mit dem Computerprogramm "LIGAND" bzw. "ALLFIT" analysiert (Munson and Rodbard, 1980; De Lean et al., 1978).

4.1 Bindung von [^3H]NMS

Die Bindung von [^3H]NMS an die Muskarinrezeptoren war in allen untersuchten Geweben hochaffin und sättigbar. Die Analyse der Daten nach Scatchard ergab eine lineare Regressionsgerade, die für die Anwesenheit einer homogenen Bindungsstellenpopulation spricht (Limbird, 1986).

[^3H]NMS zeigte allerdings eine signifikant höhere maximale Bindungskapazität in der Muskularis als in der Mukosa.

Sowohl in der Mukosa als auch in der Muskularis des menschlichen Magens fand sich im Vergleich zum Schweine-magen eine höhere Dichte an Rezeptoren.

4.2 Bindung von Pirenzepin

Die Analyse der Verdrängungskurven des [^3H]NMS durch Pirenzepin führt zur Aussage, daß sowohl in der Mukosa als auch in der Muskularis eine homogene Population der Rezeptorbindungsstellen vorkommt, die eine intermediäre Affinität für Pirenzepin besitzt und deshalb der M_2 -Subgruppe zuzuschreiben ist (Hammer et al., 1980; Birdsall and Hulme, 1983; Hammer and Giachetti, 1982; Watson et al., 1983; Rosenfeld, 1983).

In den durchgeführten Bindungsstudien zeigte der M_1 -selektive Antagonist für die Muskarinrezeptoren beider Regionen ähnliche Affinitäten. Zwar waren die mit Muskularishomogenat erstellten Bindungskurven regelmäßig rechts der mit dem Mukosahomogenat erhaltenen Bindungskurven. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant (Siehe Abb.5). Hammer berichtete, daß Pirenzepin mit einer 5-fach niedrigeren Affinität an die Rezeptoren der Muskularis als an die der Mukosa des Hundemagens band. Weiter erwähnte er, daß die Bindungsstudie in der Mukosa mit Problemen verbunden gewesen sei, was auf das

Vorhandensein proteolytischer Enzyme zurückgeführt wurde (Hammer, 1980).

In den hierbei durchgeführten Experimenten mit Schweinemagen ergaben sich keine wesentlichen Schwierigkeiten im Bindungsassay mit der Mukosa.

Der Unterschied in der Affinität des Pirenzepins zu Rezeptoren der Mukosa und Muskularis war wesentlich kleiner als von Hammer beschrieben. Die Gründe dafür könnten erstens im Speziesunterschied liegen, zweitens im Unterschied der Durchführung der Experimente. Hammer führte den Bindungsassay bei 30°C durch und verwendete als Puffer ein Gemisch von 20mM HEPES, 100mM NaCl und 10mM MgCl₂ (Hammer, 1980), während in der vorliegenden Arbeit die Experimente bei Raumtemperatur und im TRIS/HCL Puffer durchgeführt wurden.

Die mit dem menschlichen Mukosahomogenat erhaltenen Daten zeigten eine große Variation (Siehe Tab.III). Doch in keinem Fall ergab sich ein K_d-Wert im nanomolaren Bereich (1-10 nM).

Die Kurven waren überwiegend steil und repräsentierten eine homogene Bindungspopulation. In drei Versuchen waren die Kurven flach und sprachen für eine heterogene Population der Bindungsstellen. Das Modell für das Vorhandensein zweier Bindungsstellen war allerdings nicht signifikant besser bei einer Festlegung von P<0,02.

Die Tatsache, daß die mit dem menschlichen Gewebe durchgeführten Bindungsexperimente im Vergleich zu denen mit dem Schweinemagen eine große Variation aufwiesen, steht wahrscheinlich zunächst mit der unterschiedlichen Herkunft des Materials in Zusammenhang. Hinzu kommt die unterschiedliche Krankheit des Gewebes (Ulcus, Karzinom). Zudem waren die Patienten unterschiedlichen Alters und wurden unterschiedlich behandelt.

Ob die erwähnte Variation einen Einfluß auf die Bindungsstellen der Muskarinrezeptoren und auf ihre Affinität

hat, war nicht der Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wurde deshalb nicht untersucht.

Insgesamt ist festzuhalten, daß die meisten Resultate mit den im Schweinemagen erstellten gut korrelieren und somit für das Vorliegen von M_2 -Rezeptoren in der menschlichen Mukosa sprechen.

Die Magenmuskularis des Menschen zeigte ebenfalls eine niedrige Affinität für Pirenzepin und enthält demnach auch M_2 -Rezeptoren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sowohl die Mukosa als auch die Muskularis des Magens M_2 -Rezeptoren enthalten. Die Affinität der Mukosarezeptoren für Pirenzepin, bestimmt mit Radiorezeptorbindungsstudien, korreliert gut mit derjenigen Affinität der Mukosa und Muskularis für Pirenzepin, die mit Hilfe von pharmakologisch-funktionellen Studien bestimmt wurde (Rosenfeld, 1983; Pfeiffer et al., 1986; Mutschler und Lambrecht, 1984).

Bezüglich der Verwendung von Pirenzepin als selektiven Hemmer der Magensäuresekretion sprechen die erzielten Daten gegen einen Angriff der Substanz auf der Ebene der Parietalzellen, da bei einer gleichzeitigen Hemmung anderer M_2 -Rezeptoren vermittelte Prozesse zu erwarten wären. Insofern Pirenzepin die Blut-Hirn-Schranke nicht passiert und angesichts des Vorkommens von M_1 -Rezeptoren im peripheren Nervengewebe, liegt es nahe, eine Wirkung des Pirenzepins auf dieser Ebene zu postulieren. Entsprechend hat Hammer (1980) vorgeschlagen, daß die inhibitorische Aktivität von Pirenzepin auf die Säuresekretion indirekt über den intramuralen Nervenplexus erfolgt. North hat diese These durch elektrophysiologische Experimente unterstützt (North, 1985). Die vorliegenden Daten stehen hiermit in gutem Einklang.

4.3 Bindung von Carbachol

Als nächstes wurde untersucht, ob die Bindung des Agonisten "Carbachol" an die Rezeptoren dieser Magenregionen Unterschiede aufwies. Es ist berichtet worden, daß die Bindung von Agonisten an Muskarinrezeptoren verschiedener Gewebe heterogen ist (Aronstam et al., 1978; Ehlert et al., 1980; Fields et al., 1978). Der erste Hinweis für die Unterscheidbarkeit der Rezeptoren der Mukosa von denen der Muskularis konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der Agonistenbindung erbracht werden.

Mukosa:

Die M_2 -Rezeptoren der Mukosa zeigten hierbei eine niedrige Affinität für Carbachol sowie eine einzige Bindungsstelle. Diese Bindungsstelle wurde in Gegenwart von Modulatoren wie Guaninnukleotiden (0,1 mM) und der sulfhydrylgruppenalkylierenden Verbindung, NEM, (1mM) nicht signifikant beeinflusst.

Wie den Untersuchungsberichten einiger Arbeitsgruppen zu entnehmen ist, bindet Carbachol mit niedriger Affinität (im mikromolaren Bereich) an M_1 -Rezeptoren des Cortex (Birdsall et al., 1983; Vickroy et al., 1984; Watson et al., 1986). Diese Agonistenbindungsstelle wird nur wenig durch Guaninnukleotide beeinflusst (Watson et al., 1986).

Die sulfhydrylgruppenalkylierende Substanz NEM führt bei einer Konzentration von 1 mM zur Zunahme der Bindungsaffinität der M_1 -Rezeptoren für Carbachol (Aronstam et al., 1978; Vickroy et al., 1983).

Muskularis:

Die Verdrängungskurven ergaben, daß Carbachol im Muskularishomogenat an zwei verschiedene Bindungsstellen (hoch- und niederaffin) bindet.

In Gegenwart von 0,1 mM GppNHp (ein stabiles GTP-Analogon) ging der hochaffine Bindungszustand in einen niederaffinen über, so daß die Bindungskurve insgesamt steiler wurde und nur noch eine einzige Bindungsstelle nachweisbar war.

NEM, in einer Konzentration von 1 mM, beeinflusste die M_2 -Rezeptoren der Muskularis ebenfalls signifikant. Hierdurch erhöhte sich die Affinität beider Bindungsstellen für Carbachol, wobei zusätzlich der Anteil an hochaffinen Bindungsstellen zunahm.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde berichtet, daß Carbachol im Hirnstamm und Herzmuskel (beides M_2 -Gewebe) zwei verschiedene, nämlich hochaffine und niederaffine Bindungsstellen erkennt (Birdsall, et al., 1983).

In Gegenwart von Guaninnukleotiden geht der hochaffine Bindungszustand in den niederaffinen über (Berrie et al., 1979; Rosenberger et al., 1979; 1980).

Weiter ist es bekannt, daß mehrere Rezeptoren über Aktivierung bzw. Hemmung der Adenylatzyklase, die ihrerseits in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} die Bildung von cAMP katalysiert, zur Zellantwort führen. Diesen Rezeptoren sind membranständige Regulatorproteine in reversibler Form assoziiert (G-Proteine). Führt die Agonist-Rezeptor-Bindung zur Aktivierung der Adenylatzyklase, so ist ein stimulatorisches G-Protein (G_s) involviert. Wird dagegen die Adenylatzyklase gehemmt, so ist ein inhibitorisches G-Protein (G_i) mit dem betreffenden Rezeptor assoziiert (Siehe Abschnitt "Einführung").

M_2 -Rezeptoren des Herzmuskels sind ebenfalls mit dem G-Protein assoziiert und zwar mit G_i (Rosenberger et al., 1979; 1980). In letzter Zeit konnte gezeigt werden, daß der hochaffine Bindungszustand derjenige Zustand sei, in dem das Rezeptorprotein mit dem G-Protein assoziiert ist (Haga et al, 1985). Das G-Protein liegt im Komplex mit GDP in inaktiver Form vor. Die Agonistenbindung bewirkt

einen schnellen Austausch von GTP gegen GDP und aktiviert dadurch das G-Protein. Die Bindung von GTP und seinen Analoga an dieses Protein verursacht seine Dissoziation vom Rezeptorprotein. Der Rezeptor geht in den niederaffinen Zustand über. (Florio and Sternweis, 1985; Haga et al., 1985).

Wie bereits mehrere Studien zeigen konnten, sind die Sulfhydrylreagenzien imstande, die Bindungseigenschaft der Muskarinrezeptoren zu verändern. Alkylierung der Sulfhydrylgruppen (-SH) durch NEM führt zu einer Zunahme der Agonistenbindung, wobei die Antagonistenbindung unbeeinflusst bleibt. Diese Zunahme der Agonistenaffinität ist teilweise darauf zurückzuführen, daß die niederaffine in die hochaffine Bindungsstelle übergeht (Aronstam et al., 1978; Aronstam and Eldefrawi, 1979).

Von anderen Arbeitsgruppen wurde berichtet, daß NEM bei niedrigen Konzentrationen ($<0,1$ mM) zu einer Abnahme der Agonistenaffinität der M_2 -Rezeptoren des Zerebellums und Hirnstammes (M_2 -Gewebe) führe (Korn et al., 1983; Flynn and Potter, 1985; Potter and Flynn, 1984), während Konzentrationen von 1-5 mM NEM die Agonistenaffinität der M_2 -Rezeptoren steigere. NEM scheint bei niedriger Konzentration zu einer Dissoziation des Rezeptorproteins vom G-Protein im Hirnstamm zu führen (Korn et al., 1983). Bei höheren Konzentrationen ($>0,5$ mM) führt NEM wahrscheinlich über eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die durch Spaltung von S-S-Verbindungen zustande kommt, zu einer gesteigerten Affinität.

Wenn man die hierbei erhaltenen Ergebnisse von Mukosa und Muskularis mit bekannten Daten von anderen Geweben vergleicht, läßt sich folgendes aussagen:

1) Carbachol erkennt zwei verschiedene Bindungsaffinitätszustände in der glatten Muskulatur des Magens, was ebenfalls im Herzmuskel sowie im Zerebellum der Ratte der Fall ist. Alle genannten Gewebe enthalten nach der

Affinität für Pirenzepin Rezeptoren vom M_2 -Typ. Interessanterweise zeigen die Rezeptoren der Mukosa nur eine niedrige Affinität für den Agonisten Carbachol.

2) Die Affinitätszustände für Carbachol in der Muskularis werden durch GppNHp (0,1 mM) moduliert. Der hochaffine Bindungszustand geht in den niederaffinen über. Die M_2 -Rezeptoren des Herzmuskels und des Hirngewebes (Hirnstamm, Zerebellum) werden in Gegenwart von Guaninnukleotiden insgesamt niederaffiner. Die M_2 -Rezeptoren der Mukosa werden durch GppNHp nicht signifikant beeinflusst.

3) In der Muskularis wird die Bindung an M_2 -Rezeptoren durch den Einfluß von 1 mM NEM hochaffiner, wie es von M_2 -Rezeptoren des Hirngewebes berichtet wurde. M_2 -Rezeptoren des Herzmuskels werden in entgegengesetzter Weise von NEM beeinflusst, sie werden niederaffiner. Anzunehmen ist allerdings, daß wegen der komplexen Wirkung des NEM kleine Variationen des Inkubationsgemisches eine wichtige Rolle einnehmen können, so daß die Vergleichbarkeit verschiedener Arbeiten begrenzt ist. Da die vorliegenden Experimente jeweils parallel durchgeführt wurden, lassen sich die Ergebnisse in Mukosa und Muskularis gut vergleichen. Die unterschiedliche Empfindlichkeit für NEM spricht für Unterschiede der NEM-zugänglichen SH-Gruppen. M_2 -Rezeptoren der Mukosa werden durch NEM nicht signifikant verändert.

Aus den Bindungsdaten des Carbachols mit dem Mukosa- bzw. Muskularishomogenat kann man schließen, daß die Rezeptoren der Muskularis ähnlich denen des Herzmuskels mit einem membranständigen G-Protein vergesellschaftet sind. Das Vorkommen von zwei verschiedenen Bindungszuständen ist somit dadurch interpretierbar, daß ein Teil der Rezeptoren mit dem G-Protein assoziiert ist, nämlich

jener, der mit einer hohen Affinität die Agonisten zu binden vermag. Die erhaltenen Daten mit der Muskularis waren hierbei nicht überraschend, denn mehrere Untersuchungen zeigten bereits, daß M_2 -Rezeptoren GTP-sensibel sind.

Insensibilität gegenüber dem GppNHp wurde bei M_1 -Rezeptoren beobachtet (Birdsall et al., 1983; Vickroy et al., 1984; Watson et al., 1986), wie sie hier überraschenderweise bei M_2 -Rezeptoren der Mukosa beobachtet wurde. Diese Rezeptoren scheinen über ein anderes Effektorsystem zu verfügen. Pfeiffer und Mitarbeiter demonstrierten, daß Aktivierung der Rezeptoren der Mukosa von Ratten durch Carbachol zu einem gesteigerten Inositol-Phosphat-Umsatz führt (Pfeiffer et al., 1986). Weiter beobachteten sie, daß eine Behandlung mit Pertussis Toxin die Parietalzellen des Rattenmagens in ihrer cholinergen Antwort nicht beeinträchtigt (nicht veröffentlichte Daten), was ebenfalls dafür spricht, daß in diesem Rezeptor-Effektor-System offenbar kein G_i -Protein beteiligt ist.

Wie bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt wurde, ist der Einfluß von NEM in einem hohen Maß konzentrations- und temperaturabhängig. NEM entfaltet seine Wirkung durch Alkylierung der SH-Gruppen. Dadurch wird die Konformation des Rezeptors so verändert, daß die Bindungsaffinität für Agonisten beeinträchtigt wird. Ob hierbei SH-Gruppen am Rezeptorprotein oder die an der Membranumgebung reduziert werden, ist bisher nicht sicher bekannt.

Tatsache ist aber, daß unter derselben Behandlung mit NEM die Mukosarezeptoren im Gegensatz zu denen der Muskularis unbeeinflusst bleiben. Daraus kann geschlossen werden, daß die M_2 -Rezeptoren dieser Regionen sich in der Menge an für NEM zugänglichen SH-Gruppen unterscheiden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß

- 1) diese Rezeptoren zwei verschiedenen M_2 -Subklassen angehören.
- 2) die Rezeptoren derselben Subklasse angehören, aber in der Zellmembran so unterschiedlich gefaltet sind, daß bei dem einen eine größere Anzahl oder unterschiedliche SH-Gruppen für NEM zugänglich sind.
- 3) die Rezeptoren den gleichen Subtyp darstellen und lediglich ihre Membrenumgebung sich im Gehalt oder der Angreifbarkeit der SH-Gruppen unterscheidet.

Die Bindungseigenschaft des Carbachols in der Mukosa und Muskularis des menschlichen Magens war der des Schweinmaterials ähnlich mit dem Unterschied, daß in Gegenwart von 0,1 mM GppNHp die Carbacholkurve der Muskularis zwar signifikant nach rechts verschoben wurde aber noch immer zwei verschiedene Bindungszustände für Carbachol repräsentierte.

4.4 Bindung von HHSD und AF-DX 116

In jüngster Zeit wurden Substanzen entwickelt, die M_2 -Rezeptoren verschiedener Gewebe mit unterschiedlicher Affinität zu binden vermögen und somit als Hilfsmittel zur Subklassifizierung der M_2 -Rezeptoren verwendet werden können. HHSD und AF-DX 116 gehören dieser Gruppe von Substanzen an. Beide sind muskarinische Antagonisten. AF-DX 116 zeigt eine kardioselektive und HHSD eine ileal-vaskuläre Selektivität. Beide Substanzen wurden zur weiteren Unterscheidung der Mukosa- von den Muskularisrezeptoren verwendet.

Der Antagonist HHSD zeigt folgende Bindungsaffinitätsmerkmale:

- Die M_1 -Rezeptoren der sympathischen Ganglia, die eine hohe Affinität für Pirenzepin zeigen, besitzen eine niedrige Affinität für HHSD.
- Die M_2 -Rezeptoren des Herzmuskels zeigen sowohl für Pirenzepin als auch für HHSD eine niedrige Bindungsaffinität.
- Die M_2 -Rezeptoren der glatten Muskulatur des Ileums, der Harnblase und der Trachea, die Pirenzepin mit einer niedrigen Affinität binden, besitzen für HHSD eine höhere Affinität (Lambrecht et al., 1984).

AF-DX 116 ist ein Pirenzepin-Derivat, das mit einer höheren Affinität an die M_2 -Rezeptoren des Herzmuskels bindet als an die der Muskularis. Weiter besitzen die Muskarinrezeptoren der submandibulären Drüse eine niedrige Affinität für diese Substanz. AF-DX 116 zeigt eine 30-fach höhere Affinität für die Herz- als für die Submandibularispräparation (Hammer et al., 1986; Giachetti et al., 1986).

In den durchgeführten Bindungsstudien konnten die genannten Substanzen die Rezeptoren der Mukosa von denen der Muskularis hochsignifikant unterscheiden:

(1) Die M_2 -Rezeptoren der Mukosa besaßen eine mehrfach höhere Affinität für HHSD als die M_2 -Rezeptoren der Muskularis.

(2) Die Bindungskurve der Mukosa war im Gegensatz zu der der Muskularis flach und demonstrierte zwei verschiedene Bindungsstellen für HHSD.

(3) Die M_2 -Rezeptoren der Magenmukosa zeigten im Vergleich zu M_2 -Rezeptoren der Muskularis eine signifikant niedrigere Bindungsaffinität für AF-DX 116. Die Bindungskurven beider Regionen waren steil und signifikant besser zu beschreiben unter Annahme homogener

Bindungsstellen.

Wie schon vorher erwähnt wurde, kann eine flache Kurve unter folgenden Voraussetzungen entstehen (Siehe Abschnitt "Theorie").

- (1) Das Untersuchungsmaterial enthält zwei verschiedene Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität für den Liganden.
- (2) Es existiert negative Kooperativität.
- (3) Der Ligand ist ein Agonist und kann verschiedene Affinitätszustände der Bindungsstellen erkennen.

Da HHSD ein selektiver muskarinischer Antagonist ist und Magenmukosa ein komplexes System darstellt, das aus unterschiedlichen Zellen mit unterschiedlichen Funktionen ist, ist die Annahme der Existenz unterschiedlicher M_2 -Rezeptoren, die durch HHSD zu differenzieren sind, berechtigt.

Ob nun die eindeutig flache Verdrängungskurve in der Mukosa tatsächlich auf das Vorhandensein heterogener Bindungsstellen zurückzuführen ist, oder ob hier eventuell eine negative Kooperativität vorliegt, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Die Untersuchung einer eventuellen negativen Kooperativität bedarf weiterer Studien.

Es kann allerdings sicher gesagt werden, daß in den in vitro durchgeführten Radio-Rezeptor-Bindungsstudien HHSD bzw. AF-DX 116 in der Lage sind, die Rezeptoren der Mukosa von denen der benachbarten Muskularis zu unterscheiden.

4.5 Quantitative Autoradiographie der Mukosarezeptoren

Die autoradiographische Darstellung und Quantifizierung der Membranrezeptoren in von menschlichem Magen entnommenen Schleimhautbiopsien stellt eine sehr attraktive Untersuchungstechnik dar. Denn dieses Verfahren läßt

- (1) eine genaue Untersuchung von äußerst kleinen Mengen Gewebsmaterials zu.
- (2) Da die Entnahme der Gewebsbiopsien keinen großen Eingriff darstellt, ist es möglich gesundes Gewebe zur Untersuchung und zum Vergleich mit pathologisch verändertem Gewebe heranzuziehen.
- (3) Weiter ist es möglich, konsequent die Veränderung des Gewebes bei einem bestimmten pathologischen Zustand zu verfolgen. Z.B. kann untersucht werden, ob die Rezeptoren bei Z. n. Vagotomie in irgendeiner Weise verändert werden, oder in welcher Weise sich die Zellmembranrezeptoren bei Patienten mit Ulcus duodeni oder Karzinomata des gastrointestinalen Traktes von normalem Gewebe unterscheiden.

Die Resultate mit den Gefrierschnitten stimmen sehr gut mit den Daten aus dem Homogenat desselben Gewebes überein. Kinetische Parameter, die mit Hilfe beider Techniken bestimmt wurden, sind sich ähnlich und unabhängig von dem angewendeten Verfahren. Die K_d -Werte sind in guter Übereinstimmung. Aus diesen vergleichenden Daten ist zu schließen, daß die Technik der Autoradiographie in vitro zur quantitativen Bestimmung von Muskarinrezeptoren in Schleimhautbiopsien geeignet ist. Die Autoradiogramme der Mukosabiopsien zeigen eine homogene Verteilung der Radioaktivität. Dies weist auf eine relativ homogene Verteilung der Muskarinrezeptoren über die Mukosa hin. Wie aus der Abbildung 19 ersichtlich ist, enthält allerdings das Bindegewebe keine Muskarin-

rezeptoren.

Die in fmol/mg Protein umgerechneten Rezeptormengen sind nicht ganz exakt, da hierbei Standardwerte für Rattenhirngewebe verwendet wurden. Die Daten für optische Dichte sind jedoch ebenfalls angegeben, die exakte Meßwerte darstellen.

Aus diesen Experimenten ist zu schließen, daß die Autoradiographie der Magenbiopsien in vitro eine Untersuchungstechnik darstellt, die es ermöglicht, eine exakte Untersuchung der gastrointestinalen Schleimhaut gerade des menschlichen Körpers durchzuführen und damit die individuellen Unterschiede und pathologischen Veränderungen dieser Regionen auf einer morphologisch-quantitativen Basis näher zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Die Hypothese, daß sich die Muskarinrezeptoren der glatten Muskulatur von denen der exokrinen Drüsen unterscheiden, wurde durch den Vergleich der Rezeptorbindungseigenschaften der Muskularis und Mukosa des Schweinemagens mittels Radioligand-Bindungs-Studien untersucht. Dazu wurde tritiiertes N-Methylscopolamin (NMS) durch selektive Antagonisten und den Agonisten Carbachol von den Bindungsstellen verdrängt.

Der M_1 -Antagonist Pirenzepin band in beiden Regionen eine homogene niederaffine Population von Muskarinrezeptoren und wies somit auf das Vorhandensein der M_2 -Rezeptoren in der Mukosa sowie Muskularis des Magens hin.

Der M_2 -kardioselektive Antagonist AF-DX 116 zeigte eine 7-fach niedrigere Affinität für die Mukosa als für die Muskularis.

Der M_2 -Antagonist HHSD, der verglichen mit dem Herzmuskel eine höhere Affinität für glatte Muskulatur aufweist, hatte eindeutig höhere Affinität für M_2 -Rezeptoren der Mukosa als für die Muskularis.

Carbachol band im Muskularishomogenat sowohl eine hochaffine als auch eine niederaffine Population von Agonistenbindungsstellen, während in der Mukosa lediglich niederaffine Agonistenbindungsstellen auffindbar waren. In der Muskularis nahm die Affinität der Rezeptoren für Carbachol in Gegenwart von GppNHP ab, während eine Vorbehandlung des Muskularishomogenates mit dem Sulfhydrylreagenz "NEM" zu einer Zunahme der Affinität führte. Im klaren Gegensatz dazu wurden die Mukosarezeptoren weder durch die Gegenwart von GppNHP noch durch eine Vorbehandlung mit NEM beeinflusst.

Die Bindungsdaten zeigten, daß basierend auf den Bindungseigenschaften von Antagonisten und Agonisten die M_2 -Rezeptoren der Mukosa von denen der Muskularis des

Magens zu unterscheiden sind. Da laut Literatur AF-DX 116 die höchste und HHSD die niedrigste Affinität für die M_2 -Rezeptoren des Herzmuskels aufweisen, scheint ein dritter Typ der M_2 -Rezeptoren anhand von Radioligand-Bindungs-Studie zu unterscheiden zu sein.

Die Muskarinrezeptoren der menschlichen Magenmukosa und -muskularis wiesen ebenfalls eine niedrige Affinität für Pirenzepin auf und besitzen somit M_2 -Rezeptoren. Da die Untersuchungen mit menschlichem Magengewebe notwendigerweise auf pathologisch verändertes Gewebe beschränkt sind und die heute übliche gastroscopische Diagnostik es ermöglicht, Gewebe durch Biopsien zu erhalten, wurde die Möglichkeit der Anwendung der "in vitro Autoradiographie" zur Untersuchung der Muskarinrezeptoren in den Mukosabiopsien des Magens untersucht. Die quantitativen Bestimmungen von Muskarinrezeptoren in Biopsien zeigten, daß die individuelle Variation nicht wesentlich und die Verteilung der Muskarinrezeptoren in der Mukosa gleichmäßig ist.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß glatte Muskulatur und Mukosa des Magens unterschiedliche Muskarinrezeptoren aufweisen. Dies ermöglicht prinzipiell eine gezielte medikamentöse Therapie von gastrointestinalen Krankheiten, bei denen das cholinerge muskarinische System eine Rolle spielt. Als solche wären z.B. veränderte Erregungsmuster der glatten Muskulatur (irritabler Darm) oder veränderte Sekretionsmuster der Mukosa (Ulcus; Diarrhoe) zu postulieren.

Die Entwicklung einer autoradiographischer Methode zur quantitativen Auswertung von Muskarinrezeptoren in Schleimhautbiopsien wird genauere Untersuchungen über vorhandene Spiegel und Regulation dieser Rezeptoren bei gesunden und erkrankten Individuen ermöglichen.

Es bleibt zu etablieren, ob sich hieraus Hinweise für Therapieschemata ergeben werden.

1. Literaturverzeichnis

Aronstam R.S., L.G.Abood and W.Hoss. Influence of sulphydryl reagents and heavy metals on the functional state of muscarinic acetylcholine receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 14: 575-586 (1978).

Aronstam R.S.; E.Eldefrawi. Reversible conversion between affinity states for agonists of the muscarinic acetylcholine receptor from rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 28:701-703 (1979).

Akiyama K., T.W.Vickroy, M.Watson, W.R.Roeske, T.D.Resine, T.L.Smith and H.I.Yamamura. Muscarinic cholinergic ligand binding to intact mouse pituitary tumor cells (AtT-20/D16-16) coupling with two biochemical effectors: Adenylate cyclase and phosphatidylinositol tumor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236: 653-661 (1986).

Barlow R.B., K.J. Berry, P.A.M.Glenton, N.M.Nikolaou, K.S.Soh. A comparison of affinity constants for muscarinic-sensitive acetylcholine receptor in guinea-pig atrial pacemaker cells at 29°C and 37°C. *Br. J. Pharmacol.* 58:613-620 (1976).

Bennet J.P. and H.I.Yamamura. Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods, In "Neurotransmitter Receptor Binding, 2nd ed." Yamamura H.I., S.J.Enna, M.J.Kuhar, (eds): New York, Raven Press, 61-90 (1985).

Berridge M.J. and R.F.Irvine. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312: 315-321 (1984).

Berridge M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *J. Biochem.* 220:345-360 (1984).

Berrie C.P., N.J.M.Birdsall, A.S.V.Burgen, E.C.Hulme. Guanine nucleotides modulate muscarinic receptor binding in the heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87:1000-1005 (1979).

Berrie C.P., N.J.M.Birdsall, E.C.Hulme, M.Keen, J.M.Stockton. Solubilization and characterization of high and low affinity pirenzepine binding sites from rat cerebral cortex. *J. Br. Pharmacol.* 85(3):697-703 (1985).

Birdsall N.J.M., A.S.V.Burgen, C.R.Hiley and E.C.Hulme. Binding of agonists and antagonists to muscarinic receptors. *J. Supramolec. Struct.* 4:367-371 (1976).

Birdsall N.J.M., A.S.V.Burgen, E.C.Hulme. Correlation

between the binding properties and pharmacological responses of muscarinic receptors. Jenden, D.J., ed.: Cholinergic mechanisms and psychopharmacology. New York: Plenum Press: 25-33 (1977).

Birdsall N.J.M., A.S.V.Burgen and E.C.Hulme. The binding of agonists to brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* 14: 723-736 (1978).

Birdsall N.J.M., A.S.V.Burgen, E.C.Hulme, J.W.Wells. The effects of ions on the binding of agonists and antagonists to muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.* 67: 371-377 (1979).

Birdsall N.J.M., E.C.Hulme and A.S.V.Burgen. The character of muscarinic receptors in different regions of the rat brain. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.* B.207: 1-12 (1980).

Birdsall N.J.M., A.S.V.Burgen, C.R.Hiley and E.C.Hulme. In: Receptors for Neurotransmitter and Peptide Hormones (G.Pepeu, M.J.Kuhar and S.J. Enna, eds.), pp. 107-116, Raven Press, New York (1980a).

Birdsall N.J.M. and E.C.Hulme. Muscarinic receptor subclasses. *Trends Pharmacol. Sci.* 4: 459-463 (1983).

Birdsall N.J.M., E.C.Hulme and J.M.Stockton. Muscarinic receptor heterogeneity. *Trends Pharmacol. Sci., Suppl.*: 4-8 (1984).

Black J.W. and N.P.Shankley. Pharmacological analysis of muscarinic receptors coupled to oxyntic cell secretion in the mouse stomach. *Br. J. Pharmacol.* 86: 601-607 (1985).

Blume H., E.Mutschler und P.A.van Zwieten. Über den Einfluß von cholinergen Pharmaka auf die Ulcusbildung und die Magensaftsekretion bei der Shay-Ratte. *Naunyn-Schmiedebergers Arch. Pharmak. exp. Path.* 256: 99-111 (1967).

Bokoch G.M., T.Katada, J.K.Northup, M.Ui and A.G.Gilman. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 3560-3567 (1984).

Brown D.A., A.Forward and S.Marsh. Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.* 71: 362-364 (1980).

Brown S.L. and J.H.Brown. Muscarinic stimulation of phosphatidylinositol metabolism in atria. *Molecular Pharmacol.* 24: 351-356 (1982).

Brown J.H. and S.L.Brown. Agonists differentiate muscarinic receptors that inhibit cyclic AMP formation from those that stimulate phosphoinositide metabolism. *J. Biol. Chem.* 259: 3777-3781 (1984).

Brown J.H., D.Goldstein and S.B.Masters. The putative M1 muscarinic receptor does not regulate phosphoinositide hydrolysis. Studies with pirenzepine and McN-A 343 in chick heart and astrocytoma cells. *Mol. Pharmacol.* 27:525-531(1985).

Burgen A.S.V. Muscarinic receptors - an overview. *Trends Pharmacol. Sci., Suppl.*:1-3(1984).

Cheng Y.C. and W.H.Prusoff. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22:3099-3108 (1973).

Dale H.H. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharm. Exp. Ther.* 6:174-190(1914).

De Lean A., P.J.Munson and D.Rodbard. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: Application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.* 235: 97-102(1978).

De Lean A., J.M.Stadel and R.J.Lefkowitz. A ternary complex model explains the agonists-specific binding properties of adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255:7108-7117(1980).

Ehlert F.J., W.R.Roeske, L.B.Rosenberger and H.I.Yamamura. The influence of guanylyl-5-yl imidodiphosphate and sodium on muscarinic receptor binding in the rat brain and longitudinal muscle of the rat ileum. *Life Sci.* 26:245-252(1980).

Ehlert F.J., W.R.Roeske and H.I.Yamamura. Muscarinic receptor regulation by guanine nucleotides, ions, and N-ethylmaleimide. *Federation Proceedings*, 40:153-158 (1981).

Ehlert F.J. The relationship between muscarinic receptor occupancy and adenylate cyclase inhibition in the rabbit myocardium. *Mol. Pharmacol.* 28:410-421(1985).

Ehrlich P. Chemotherapeutics: scientific principles, methods and results. *Lancet*2:445-451(1913).

Evans T., J.R.Hepler, S.B.Masters, J.H.Brown and T.K.Harden. Guanine nucleotide regulation of agonist binding to muscarinic cholinergic receptors. Relation to efficacy of agonists for stimulation of phosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilisation. *J. Biochem.* 232:751-757 (1985).

Feldmann H.A. Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium: Some methods for

parameter fitting. Anal. Biochem. 48:317-338(1972).

Fields J.Z., W.R.Roeske, E.Morkin and H.I.Yamamura. Cardiac muscarinic cholinergic receptors. Biochemical identification and characterization. J. Biol. Chem. 253:3251-3258(1978).

Fischer S.K. and R.T.Bartus. Regional differences in the coupling of muscarinic receptors to inositol phosphatid hydrolysis in guinea pig brain. J. Neurochem. 45:1085-1095(1985).

Florio, V.A. and P.C.Sternweis. Reconstitution of purified muscarinic cholinergic receptors with purified GTP-binding proteins. J. Biol. Chem. 260:3477-3483 (1985).

Flynn D.D. and L.T.Potter. Different effects of N-ethylmaleimide on M1 and M2 muscarine receptors in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:580-583(1985).

Fuder H., H.Kilbinger and H.Müller. Organselectivity of Hexahydrosiladifenidol in blocking pre- and post-junctional muscarinic receptors studied in guinea-pig ileum and rat heart. Eur. J. Pharmacol. 113:125-127 (1985).

Giachetti A., R.Micheletti and E.Montagna. Cardiosselective profile of AF-DX 116, a muscarine M2 receptor antagonist. Life Sci. 38: 1663-1672(1986).

Gil D.W. and B.B.Wolfe. Muscarinic Cholinergic Receptor Binding Sites Differentiated by their Affinity for Pirenzepine Do Not Interact. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237:577-582(1986).

Gilbert R., S.Rattan and R.K.Goyal. Pharmacological identification, activation and antagonism of two muscarinic receptor subtypes in the lower oesophageal sphincter. J. Pharmacol. Exp. Ther. 230:284-291(1984).

Gilman A.G. G Proteins and dual control of adenylate cyclase. Cell, 36:577-579 (1984).

Gonzales R.A. and F.T.Creus. Cholinergic- and adrenergic-stimulated inositide hydrolysis in brain: interaction, regional distribution, and coupling mechanisms. J. Neurochem. 1076-1084(1985).

Goyal R.K. and S.Rattan. Neurohumoral, hormonal and drug receptors for the lower esophageal sphincter. Gastroenterol. 74:598-619(1978).

Haga K., T.Haga, A.Ichihama, T.Katada, H.Kurose and M.Ui. Functional reconstitution of purified muscarinic receptors and inhibitory guanine nucleotide regulatory

protein. *Nature*, 316:731-733(1985).

Haga K., T.Haga. Purification of Muscarinic acetylcholin receptor from porcine brain. *Biol. Chem.* 260:7927-7935(1985).

Hammer R., C.P.Berrie, N.J.M.Birdsall, A.S.V.Burgen and E.C.Hulme. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature*, 283:90-92(1980).

Hammer R. Muscarinic receptors in the stomach. *Scand. J. Gastroenterol.* 15, Suppl. 66:5-11(1980).

Hammer R.:Subclasses of muscarinic receptors and Pirenzepine-further experimental evidence. *J. Scand. Gastroenterol.* 17:Suppl.71:59-67(1982).

Hammer R. and A.Giachetti. Muscarinic receptor subtypes: M1 and M2 biochemical and functional characterization. *Life Sci.* 31:2991-2998(1982).

Hammer R. and A.Giachetti. Selective muscarinic receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 5:18-20(1984).

Hammer R., E.Giraldo, G.B.Schiavi, E.Monferini and H.Ladinsky. Binding profile of a novel cardioselective muscarinic receptor antagonist, AF-DX 116, to membranes of peripheral tissues and brain in the rat. *Life Sci.* 38:1653-1662(1986).

Hanley M.R., L.L.Iversen. Muscarinic cholinergic receptor in rat corpus striatum and regulation of guanosine cyclic 3',5'-monophosphate. *Mol. Pharmacol.* 14:246-255(1978).

Harden T.K., A.G.Scheer and M.M.Smith. Differential modification of the interaction of cardiac muscarinic cholinergic and beta-adrenergic receptors with a guanine nucleotide binding component(s). *Mol. Pharmacol.* 21:570-580(1982).

Harden T.K., T.Evans, J.R.Hepler, A.S.Hughes, M.W.Martin, R.B.Meeker, M.M.Smith and L.I.Tanner. Regulation of cyclic AMP metabolism by muscarinic cholinergic receptors. *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research*, Vol.19 edited by D.M.F. Cooper and K.B. Seamon. Raven Press. New York(1985).

Heidenreich K.A., G.A.Weiland and P.B. Molinoff. Effects of magnesium and N-ethylmaleimide on the binding of ³H-hydroxybenzylisoproterenol to β -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 257:804-810(1982).

Helmreich E.J.M. and T.Pfeuffer. Regulation of signal

transduction by β -adrenergic hormone receptors. Trends Pharmacol. Sci. 438-443(Nov.1985).

Hoss,W. Muscarinic receptor subtypes in the central nervous system. Int. Rev. Neurobiol. 26:151-199(1985).

Houslay M.D. A family of guanine nucleotide regulatory proteins. Trends Biochem. Sci. 9:39-40(1984).

Hulme E.C., N.J.M.Birdsall, A.S.V.Burgen and P.Mehta. The binding of antagonists to brain muscarinic receptors. Molec.Pharmacol. 14: 737-750(1978).

Hulme E.C., N.J.M.Birdsall, C.P.Berrie and A.S.V.Burgen. Muscarinic receptor binding: Modulation by nucleotides and ions. In neurotransmitters and their receptors, 241-250(1980).

Hynes M.R., W.Banner, H.I.Yamamura and S.P.Duckles. Characterization of muscarinic receptors of the rabbit ear artery smooth muscle and endothelium. J. Pharmacol. Exp. Ther. 238:100-105(1982).

Ikeda S.R., R.S.Aronston and M.E.Eldefrawi. Nature of regional and chemically-induced differences in the binding properties of muscarinic acetylcholine receptors from rat brain. Neuropharmacology, 19:575-585(1980).

Irvine R.F., E.E.Ånggard, A.J.Letcher and P.Downes. Metabolism of inositol 1,4,5,-triphosphate and inositol 1,3,4,-triphosphate in rat parotid glands. J.Biochem.229: 505-511(1985).

Jakobs K.H. and G.Schulz. Actions of hormones and neurotransmitters at the plasma membrane: inhibition of adenylate cyclase. Trends Pharmacol. Sci. 331-333 (Aug 1980).

Jakobs K.H., P.Lasch, M.Minuth, K.Aktories and G.Schulz. Uncoupling of α -adrenergic-mediated inhibition of human platelet adenylate cyclase by N-ethylmaleimide. J. Biol. Chem. 257:2829-2833(1982).

Jakobs K.H., K.Aktories, M.Minuth and G.Schulz. Inhibition of adenylate cyclase. Advances i. Cycl. Nucl. a. Prot. Phosphorylation Research, 19:137-149(1985).

Katada T., J.K.Northup, G.M.Bokoch. M.Ui, A.G.Gilman. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissoziation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition. J. Biol. Chem. 259: 3578-3585(1984).

Kilbinger H. Facilitation and inhibition by muscarinic agonists of acetylcholine release from guanine pig myenteric neurones: mediation through different types of

neuronal muscarinic receptors. Trends Pharmacol. Sci. Suppl. 49-52(1984).

Korn S.J., M.W.Martin and T.K.Harden. N-ethylmaleimide-induced alteration in the interaction of agonists with the muscarinic cholinergic receptors of rat brain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 224:118-126(1983).

Korner M., C.Gilon and M.Schramm. Locking of hormone in the β -adrenergic receptor by attack on a sulfhydryl in an associated component. J. Biol. Chem. 257:3389-3396(1982).

Koshland D.E. The molecular basis for enzyme regulation. In the enzymes. P.D.Boyer (ed.), ch.7, Academic Press, New York, pp.341-396(1970).

Kubo T., K.Fukuda, A.Mikami, A.Maeda, H.Takahashi, M.Mishina, T.Haga, K.Haga, A.Ichijama, K.Kangawa, M.Kojima, H.Mtsuo T.Hirose and S.Numa : "Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor" Nature, 323: 411-416 (1986)

Kuhar M.J. and J.R.Unnerstall. Quantitative receptor mapping by autoradiography: some current technical problems. Trends Neurosci. 8:49-53(1985).

Lambrecht G. and E.Mutschler. Heterogeneity in muscarinic receptors. Evidence from pharmacological studies with agonists and antagonists. Proceedings of the VIIth International Symposium on Medical Chemistry, Uppsala, 27-31(Aug 1984).

Lambrecht G. and E.Mutschler. Selective inhibition of muscarinic receptors in intestinal smooth muscle. Muscarinic receptor subtypes in the gut tract. Edit. by G.Lux and E.E. Daniel:Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-NewYork-Tokyo (1985).

Lambrecht G., U.Moser, J.Riotte, M.Wagner, J.Wess, G.Gmelin, R.Tacke, H.Zileh and E.Mutschler. Heterogeneity in muscarinic receptors:Evidence from pharmacological and electrophysiological studies with selective antagonists. International symposium on muscarinic cholinergic Mechanisms. Tel-Aviv,Israel,Nov.30-Dec.4(1984).

Langley J.N. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances. Part IV. The effect of curare and some other substances on the nicotine response of the sartorius and gastrocnemius muscles of the frog. J. Physiol. 39:235-295(1909).

Levitzki A. Biochem. Receptors, A quantitative approach; by Benjamin/Cummings (1984).

Limbird L.E. Cell surface receptors: A short course on

theory and methods (1986).

Manning D.R. and A.G.Gilman. The regulatory components of adenylate cyclase and transducin: A family of structurally homologous guanine nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 258:7059-7063(1983).

Mattera R., B.J.R.Pitts, M.L.Entman and L.Birnbaumer. Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. Evidence for homo- and heteropic cooperativity in ligand binding analysis by computer-assisted curve fitting. *J. biol. Chem.* 260:7411-7421 (1985).

Meeker R.B. and T.K.Harden. Muscarinic cholinergic receptor-mediated activation of phosphodiesterase. *Mol. Pharmacol.* 22:310-319(1982).

Mullikim-Kilpatrick D., N.E.Larsen and A.J. Blume. Protection of opiate receptors in NG 108-15 against modification by N-ethylmaleimide. *J. Neurosci.* 3:145-152(1983).

Munson P.J. and D.Rodbard. LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *analytical Biochem.* 107:220-239 (1980).

Munson P.J. LIGAND:A computerized analysis of ligand binding data. *Methods in enzymology*, 92:543-546(1983).

Mutschler E. and G.Lambrecht. Selektive muscarinic agonists and antagonists in functional tests. *Trends Pharmacol. Sci. Suppl.* 39-44(1984).

Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipid and signal transduction. *Science (Wash.DC)* 225:1365-1370 (1984).

North R.A. Muscarinic receptors and membrane ion conductances. *Trends Pharmacol. Sci. Suppl.* 19-22(1985).

Northup J.K., P.C.Sternweis and A.G.Gilman. The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 258:11361-11368(1983).

Nukada T., T.Haga and A.Ichiyama. Muscarinic receptors in porcine caudate nucleus. II. Different effects of N-ethylmaleimide on [³H]cis-methyldioxolone binding to heat-labile (guanyl nucleotide-sensitive) sites and heat-stable (guanyl nucleotide-insensitive) sites. *Mol. Pharmacol.* 24:374-379(1983).

Palacios J.M., D.L.Niehoff, M.J.Kuhar. Receptor autoradiography with tritium-sensitive film: Potential for computerized densitometry. *Neurosci. Lett.*

24:111-116(1981).

Penny J.B., H.S.Pan, A.B.Young, K.A.Frey, G.W.Dauth. Quantitative autoradiography of ^3H -muscimol binding in rat brain. *Science* 214:1036-1038(1981).

Pfeiffer, A., G.Paumgartner and A.Herz. Muscarinic M_2 -receptors enhance polyphosphoinositol release in rat gastric mucosal cells. *FEBS Letters*, 204:352-355(1986).

Potter L., D.D.Flynn, H.E.Hanchett, D.L.Kalinowski, J.Luber-Narod and D.C.Mash. Independent M_1 and M_2 receptors: Ligands, autoradiography and functions. *Trends Pharmacol. Sci. Suppl.* 1:22-31(1984).

Rainbow T.C., W.V.Bleisch, A.Biegion, B.S.McEwen. Quantitative densitometry of neurotransmitter receptors. *J. Neurosci. Meth.* 5:127-138(1982).

Rattan S. and K.Goyal. Identification of M_1 and M_2 muscarinic receptor subtypes in the control of the lower esophageal sphincter in the opossum. *Trends Pharmacol. Sci. Suppl.* 78-81(1984).

Rimele T.J., O' Dorisio M.S. and Gaginella T.S. : "Evidence for muscarinic receptors on rat colonic epithelial cells: Binding of [^3H]quinuclidinyl benzilate" *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218: 426-434 (1981)

Rodbell M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane signal transduction. *Nature*, 284:17-22(1980).

Rosenberger L.B., W.R.Roeske and H.I.Yamamura. The regulation of muscarinic cholinergic receptors by guanine nucleotides in cardiac tissue. *Eur. J. Pharmacol.* 56:179-180(1979).

Rosenberger L.B., H.I.Yamamura and W.R.Roeske. Cardiac muscarinic cholinergic receptor binding is regulated by Na^+ and guanyl nucleotides. *J. Biol. Chem.* 255:820-823 (1980).

Rosenfeld G.C. Pirenzepine (LS 519): A weak inhibitor of acid secretion by isolated rat parietal cells. *Eur. J. Pharmacol.* 86:99-101(1983).

Roszkowski A.P. An unusual type of sympathetic ganglionic stimulant. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 132:156-170(1961).

Smigel M.D., K.M.Ferguson and A.G.Gilman. Control of adenylate cyclase activity by G proteins. *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research*, 19:103-109(1985).

Soll A.H. Fundic mucosal muscarinic receptors modulating acid secretion. Trends Pharmacol. Sci. Suppl. Subtypes of Muscarinic Receptors I, 60-62 (1983).

Suen E.T., P.C.K. Kwan and Y.C.Clement-Cormier. Selective effects of an essential sulphhydryl groups on the activation of dopamine- and guanine nucleotide-sensitive adenylate cyclase. Mol. Pharmacol. 22:595-601(1982).

Taylor C.W. and J.E.Merriott. Receptor Coupling to Polyphosphoinositide turnover: a parallel with the adenylate cyclase System. Trends Pharmacol. 238-242(June 1986).

Unnerstahl J.R., D.L.Niehoff, M.J.Kuhar and J.M.Palacios. Quantitative receptor autoradiography using [³H]-Ultrafilm: Application to multiple benzodiazepine receptors. J. Neurosci. Meth. 6:59-73(1982).

Vauquelin G., C.Andre, J.P.De Backer, P.Laduron and A.D.Strosberg. Agonist-mediated conformational changes of muscarinic receptors in rat brain. Eur. J. Biochem. 125:117-124(1982).

Vickroy T.W., H.I.Yamamura and W.R.Roeske. Differential regulation of high affinity agonist binding to muscarinic sites in the rat heart, cerebellum and cerebral cortex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 116:284-290(1983).

Vickroy T.W., M.Watson, H.I.Yamamura and W.R.Roeske. Agonist binding to multiple muscarinic receptors. Federation Proceedings, 43:2785-2790(1984).

Watson M., W.E.Roeske and H.I.Yamamura. [³H]Pirenzepine selectively identifies a high affinity population of muscarinic cholinergic receptor in the rat cerebral cortex. Life Sci. 31:2019-2033(1982).

Watson M., H.I.Yamamura and W.R.Roeske. A unique regulatory profile and regional distribution of [³H]pirenzepine binding in the rat provide evidence for distinct M1 and M2 muscarinic receptors subtypes. Life Sci. 32:3001-3011(1983).

Watson M., W.R.Roeske, P.C.Johnson and H.I.Yamamura. [³H]Pirenzepine identifies putative M1 muscarinic receptors in human stellate ganglia. Brain Res. 290:179-182(1984).

Watson M., H.I.Yamamura and W.R.Roeske. [³H]pirenzepine and (-)-[³H]quinuclidinyl benzilate binding to rat cerebral cortical and cardiac muscarinic cholinergic sites. I.Characterisation and regulation of agonist binding to putative muscarinic subtypes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237:411-418(1986).

Williams L.T. and R.J.Lefkowitz. Receptor binding studies in adrenergic pharmacology. Raven Press, New York(1978).

Young W.S. and M.J.Kuhar. A new method for receptor autoradiography: [3 H]opioid receptors in rat Brain. Brain Res. 179:255-270 (1979).

Danksagung

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde in der Abteilung Neuropharmakologie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie (Martinsried/München) durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Albert Herz danke ich herzlich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas gilt Herrn Professor Dr. Gustav Paumgartner und Herrn Dr. Andreas Pfeiffer.

Herrn Pfeiffer danke ich herzlich für seine Geduld, methodische Vorschläge und wissenschaftliche Beratung.

Herrn Dr. Tommaso Costa und Herrn Dr. Brain Morris danke ich ganz herzlich für ihre menschliche und wissenschaftliche Unterstützung.

Frau Ursula Bäuerle danke ich für die Anfertigung des größten Teils der Zeichnungen und Herrn Dr. Daniel Liebisch für seine Hilfe beim Umgang mit der EDV.

Lebenslauf

20. Januar 1958	geboren in Teheran
Vater	Radjabali Herawi
Mutter	Batul Herawi, geb. Ansarian
1963 bis 1969	Grundschule in Teheran
1969 bis 1975	Gymnasium in Teheran (naturwissenschaftlich)
1976 bis 1977	Studienkolleg in München
1977 bis 1985	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilian-Universität in München III. Staatsexamen Mai 1985
September 1985 bis Januar 1987	Ausführung der vorliegenden Arbeit am MPI für Psychiatrie (München) Abteilung Neuropharmakologie (Vor- stand: Prof.Dr. Herz) und an der Medizinischen Klinik II des Klinikums Großhadern der Universität München (Vorstand: Prof.Dr. Paumgartner)

